

THÈSE

pour le
DOCTORAT EN PHARMACIE
(Diplôme d'Université)

par

Jean-Paul BAUDRY

Pharmacien, Ancien Interne des Hôpitaux.
né le 29 mars 1939 à Clermont-Ferrand

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 19 DÉCEMBRE 1968

LA CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE :

Etude comparative de différentes techniques pour la séparation des composés iodés de la glande thyroïde

Président : M. MEYNIEL, professeur

Membres du Jury { M. COULET, professeur
M. BERGER, professeur
Mme GAILLARD, professeur agrégé

G. DE BUSSAC
CLERMONT-FERRAND
1970

UNIVERSITE DE CLERMONT
FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1968

N°

THÈSE

pour le
DOCTORAT EN PHARMACIE
(Diplôme d'Université)

par

Jean-Paul BAUDRY

Pharmacien, Ancien Interne des Hôpitaux.

né le 29 mars 1939 à Clermont-Ferrand

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 19 DÉCEMBRE 1968

LA CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE :

Etude comparative de différentes techniques pour la séparation des composés iodés de la glande thyroïde

Président : M. MEYNIEL, professeur

Membres du Jury { M. COULET, professeur
M. BERGER, professeur
Mme GAILLARD, professeur agrégé

G. DE BUSSAC
CLERMONT-FERRAND
1970

UNIVERSITE DE CLERMONT FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

*Doyen : G. MEYNIEL
Assesseur : M. COULET*

*Doyen honoraire : M. CUVELIER
Directeur honoraire : M. MERLE*

Professeurs honoraires : Mme BLANQUET, MM. BUREAU, POMMÉ

I. — Professeurs titulaires

MM. BARRIER	Clinique chirurgicale A.
BASTIDE	Chimie biologique et pharmacodynamie.
BAUDON	Clinique obstétricale.
BERGER	Chimie analytique
BERGERON	Pathologie médicale.
COULET	Botanique et microbiologie.
CUVELIER	Hydrologie et climatologie.
DASTUGUE	Biochimie médicale.
DAUPHIN	Chimie pharmaceutique et toxicologie.
DELAGE	Anatomie pathologique.
FEBVRE	Pharmacie galénique.
GRAS	Clinique médicale
JACQUEMET	Technique chirurgicale.
JALLUT	Séméiologie médicale.
LATAIX	Pathologie chirurgicale.
MERCIER	Anatomie.
MEYNIEL	Biophysique médicale.
MOLINA	Clinique pneumo-ptisiologique.
PETIT	Médecine légale et médecine sociale.
POROT	Clinique neurologique et psychiatrique.
POURRAT	Matière médicale.
Mlle RAMPON	Thérapeutique.
MM. ROUHER	Clinique ophtalmologique.
TERRASSE	Clinique médicale B.
THIÉBLOT	Physiologie.
THOMAS	Clinique oto-rhino-laryngologique
TRONCHE	Pharmacie chimique.
TURCHINI	Histologie et embryologie.
VAURS	Bactériologie et hygiène.
WILLEMIN-CLOG	Clinique médicale infantile.

II. — Professeurs titulaires à titre personnel

MM. CHAMPEIX	Médecine légale et Médecine du travail.
VIALLET	Electro-radiologie.

III. — Professeurs sans chaire

MM. ALFIERI	Biophysique médicale.
CLUZEL	Bactériologie.
DUCHÊNE-MARULLAZ	Physiologie.
GERMAIN	Clinique chirurgicale B.
MENUT	Pédiatrie et puériculture.

IV. — Maîtres de Conférences agrégés

M. BOSSY	Anatomie.
Mlle CHATONIER	Chimie minérale et minéralogie.
Mme GAILLARD	Physique pharmaceutique.
Mme MOINADE	Médecine générale et thérapeutique.
M. PIGNIDE	Médecine générale.
Mme POURRAT	Botanique.
M. V. DE LAGUILLAUMIE	Anatomie pathologique.

V. — Agrégés

MM. FOURRIER	Orthopédie.
HOUDARD	Chirurgie générale.
JANNY	Neuro-chirurgie.
RENARD	Pneumo-ptisiologie.
TOURNILHAC	Neurologie et psychiatrie.

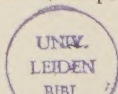
VI. — Délégués dans les fonctions de Maîtres de Conférences

MM. MALET	Histologie et embryologie.
MARCHEIX	Médecine générale et thérapeutique.
PLAGNE	Cancérologie.

Attaché principal : M. BERTHON

Conservateur de la Bibliothèque : M. ARCHIMBAUD

La Faculté décide que les opinions émises dans les travaux et mémoires présentés à l'occasion d'une soutenance de thèse de Doctorat en Médecine ou en Pharmacie, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner, ni approbation ni improbation. (Délibération en date du 6 juin 1956).



A MA FEMME

A MES ENFANTS

A MES PARENTS

A MES AMIS



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AVANT-PROPOS

M. le Professeur Meyniel, avec la confiance qu'il témoigne d'emblée aux étudiants, voulut bien nous faire une place dans son laboratoire, en qualité d'Interne en Pharmacie. Il accepta ensuite de nous charger du travail expérimental qui fut l'objet de cette thèse. Au cours des cinq années passées sous son autorité bienveillante, il nous a prodigué ses conseils et ses encouragements et nous n'avons cessé d'admirer ses qualités de patron et de guide pour tous ses collaborateurs.

Nous le remercions infiniment pour la chance qu'il nous a donnée et nous lui dédions ce travail en gage de notre profonde gratitude et de notre respectueux attachement.

M. le Professeur Coulet nous avait accueilli auparavant en son laboratoire du Centre Hospitalier. Comme tous ceux qui l'approchent, nous avons été le témoin de sa brillante valeur humaine et scientifique, nous lui devons la majeure partie de nos connaissances en biologie. Nous lui sommes tout particulièrement reconnaissant de l'enseignement qu'il nous a donné et de l'honneur qu'il nous fait en acceptant de juger notre travail.

Nos remerciements chaleureux vont aussi à M. le Professeur Berger, qui a bien voulu être notre juge. Ses conseils au cours de nos expérimentations nous ont été particulièrement précieux et nous sommes très sensible à l'intérêt qu'il nous a manifesté.

La réalisation de ce travail n'a été rendue possible dans ses détails que grâce à l'aide aimable de Mme le Professeur Agrégé Gaillard. Elle nous a fait bénéficier tout au long de nos travaux de son savoir et de son expérience. Nous lui exprimons notre très vive reconnaissance.

Tous les collaborateurs de M. le Professeur Meyniel n'ont pas hésité à nous aider sans réserve. Qu'ils soient assurés de toute notre gratitude.

Nos remerciements vont aussi à tout le personnel du Laboratoire des Radio-Isotopes. Il a su créer une atmosphère de cordiale sympathie et son efficience n'a jamais été mise en défaut.

Nous n'oublions pas ce que nous devons à l'ensemble de nos Maîtres de la Faculté mixte de Médecine et Pharmacie de Clermont-Ferrand

qui ont permis notre formation scientifique et en particulier à M. le Professeur Dauphin qui nous confia à nos débuts, le privilège d'un poste de préparateur en son laboratoire.

Notre pensée émue va enfin vers notre maître de stage, M. Bogros. Il guida paternellement et avec beaucoup de bonté, nos premiers pas vers une profession qu'il aime et qu'il honore. Qu'il en soit remercié de tout cœur.

INTRODUCTION

« La science qui se rapporte à l'être n'a-t-elle pas pour objet de connaître ce qu'est l'être ? »

PLATON « La République », V, § XX.

LA CONNAISSANCE de la physiologie thyroïdienne est certainement, de toutes, celle qui dépend le plus étroitement des techniques d'investigation. Un rapide historique des recherches effectuées dans ce domaine nous en convaincra.

Dès 1170, Roger de Salerne démontre le rôle de l'iode dans le métabolisme thyroïdien. En 1882, des chirurgiens, les frères Reverdin et Theodore Kocher, mettent en évidence l'importance de la thyroïde en tant que glande endocrine.

En 1895, les recherches biochimiques de Baumann (12, 13) montrent l'existence d'un composé organique iodé dans les hydrolysats thyroïdiens. Le même auteur en collaboration avec Ross (14) réalise l'extraction d'une fraction protéique par le chlorure de sodium dilué.

Parallèlement Blum et Hutchinson (37-120) entreprennent des travaux sur l'ioduration artificielle des protéines. Marine et Rogoff montrent la concentration élective de l'iode minéral dans le tissu thyroïdien.

Oswald (191) prouve l'action pharmacodynamique de la thyroglobuline.

Il faudra attendre 1915 et Kendall (130, 131, 132, 133) pour séparer la L-thyroxine des protéines thyroïdiennes. Elle est identifiée en 1926 par Harington (103, 105, 108) comme l'acide L-3-5 diiodo 4'-3'-5' hydroxy, phénoxy, phényle, aminopropionique, et il la synthétise en collaboration avec Barger (105). Trois ans après, la L-3-5 diiodotyrosine est identifiée et synthétisée par Harington et Randall, Foster (108-73).

Harington émettant l'hypothèse de l'accouplement in vivo de deux molécules de diiodotyrosine, prévoit la naissance de la thyroxine. Venant étayer cette hypothèse, Ludwig et Von Mutzenbecher (163, 164,

165) extraient la thyroxine, la diiodotyrosine et la monoiodotyrosine, d'hydrolysats barytiques de caséine iodée.

La découverte en 1934 de la radioactivité artificielle par Irène et Frédéric Joliot-Curie va permettre de donner un élan nouveau à l'étude du métabolisme thyroïdien, les méthodes d'investigation biochimique classiques ayant permis d'une part de concevoir le rôle de l'iode et son incorporation à la thyroglobuline, d'autre part de caractériser la thyroxine et la diiodotyrosine.

Trois isotopes de l'iode 127 sur onze existant vont être utilisés.

128 I	émetteur β et γ	T = 25 mn
130 I	d°	T = 12,6 h
131 I	d°	T = 8 jours

Ces trois isotopes présentent des propriétés chimiques identiques à celles de ^{127}I car la différence de masse est négligeable.

Successivement, Hertz, Roberts et Evans (113) Hamilton et Soley (102), Leblond et Sue (148), Mann, Leblond et Warren, Joliot, Courrier, Poumeau, Delille et Sue (127) ouvrent la voie aux recherches radiochimiques sur la thyroïde.

Enfin de vastes possibilités d'analyse sont offertes par le développement des techniques chromatographiques et électrophorétiques.

Notre travail a pour but d'essayer d'obtenir une meilleure séparation des différents composés organiques thyroïdiens et par la même de mieux les connaître par une étude comparative des diverses méthodes de chromatographies sur colonnes.

PREMIÈRE PARTIE



CHAPITRE PREMIER

UTILISATION DES RADIO-ISOTOPES DANS L'EXPLORATION DU MÉTABOLISME TYROÏDIEN

I. — HISTORIQUE

La découverte de la radioactivité artificielle par Irène et Frédéric Joliot-Curie (53) a permis, avec l'emploi des radio-isotopes, une exploration plus poussée de la physiologie et du métabolisme thyroïdiens. L'élément naturel A 127 possède un certain nombre de radio-isotopes ayant la même composition protonique donc électronique. Leurs propriétés chimiques sont donc identiques. Si la différence de masse n'est pas trop importante, ils peuvent être utilisés dans l'étude du devenir métabolique de cet élément sans modification de la cinétique des réactions ou des échanges.

Le plus employé est le $^{131}_{53}\text{I}$ (7, 18, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 33, 36, 39, 54, 61, 68, 69, 70, 80, 89, 140, 155, 158, 159, 162, 169, 173, 178, 203, 209, 256, 276, 283, 287, 296, 299, 305, etc.). Chez l'enfant, on lui préfère souvent le $^{132}_{53}\text{I}$.

Certains auteurs, (190) ont préconisé plus récemment, l'utilisation de $^{125}_{53}\text{I}$ ou $^{124}_{53}\text{I}$, à cause de sa période physique très courte.

En 1964, Scheeper (252) emploie simultanément $^{125}_{53}\text{I}$ et $^{132}_{53}\text{I}$. Il préconise ^{125}I pour la basse énergie des radiations qu'il émet et ^{132}I pour sa période radioactive courte.

En 1966, Jenkinson (125) réalise une étude comparative par double marquage au $^{131}_{53}\text{I}$ et au $^{125}_{53}\text{I}$.

Le technétium $^{99\text{m}}$ associé à ^{125}I est utilisé au cours de travaux sur la physiologie thyroïdienne chez la souris (253).

Les caractéristiques des divers isotopes de $^{127}_{53}\text{I}$ et du technétium $^{99\text{m}}$ figurent dans le *tableau n° 1*.

La méthode la plus élégante serait l'utilisation conjuguée d'une technique isotopique et d'une analyse par activation (48); cette der-

nière nécessite, malheureusement, des laboratoires hautement spécialisés, pourvus de réacteurs.

T A B L E A U N° 1

ISOTOPE	RAYON- NEMENTS EMIS	ENERGIE EN MEV.	PERIODE PHYSIQUE	PERIODE BIOLOGIQUE	PERIODE EFFICACE
¹³¹ ₅₃ I	$\beta^- \gamma$	0,61 = 87,2 % 0,38 = 9,2 % 0,25 = 2,8 % 0,81 = 0,7 %	8,4 j	4 $\langle T_b \rangle$ 6 j	2,7 $\langle T_e \rangle$ 3,5 j
		0,36 = 80,0 % 0,64 = 9,0 % 0,28 = 5,3 % 0,72 = 3,0 % 0,08 = 2,2 % 0,16 = 0,5 %			
¹³² ₅₃ I	$\beta^- \gamma$	1,53 = 24,0 % 1,16 = 23,0 % 0,90 = 20,0 % 2,12 = 18,0 % 0,73 = 15,0 %	2,3 h	4 $\langle T_b \rangle$ 6 j	2,24 $\langle T_e \rangle$ 2,26 h
		0,67-0,78-0,53 0,97-1,40-0,62 1,16-1,96-2,2			
¹³⁰ ₅₃ I	$\beta^- \gamma$	0,59 = 54,0 % 1,02 = 46,0 %	12,5 h	4 $\langle T_b \rangle$ 6 j	11,11 $\langle T_e \rangle$ 1,53 h
		0,53-0,66-0,74 1,15-0,41			
¹²⁸ ₅₃ I	$\beta^- \gamma$ = 94 % CAPTURE K = 6 %	2,12 = 76,0 % 1,66 = 16,0 % 1,12 = 2,0 %	24,98 mn	4 $\langle T_b \rangle$ 6 j	24,90 $\langle T_e \rangle$ 24,92 mn
		0,45-0,54-0,99			
¹²⁵ ₅₃ I	CAPTURE K R X	0,035	60 j	4 $\langle T_b \rangle$ 6 j	3,7 $\langle T_e \rangle$ 5,4 j
¹²⁴ ₅₃ I	CAPTURE K β R X	2,2 = 51,0 % 1,5 = 44,0 % 0,67 = 5,0 %	4,5 j	4 $\langle T_b \rangle$ 6 j	2,1 $\langle T_e \rangle$ 2,5 j
		0,60-0,73-1,72 1,95			
⁹⁹ ₄₃ Te	γ	0,142 = 1 % 0,140 = 99 %	6 h 04	4 $\langle T_b \rangle$ 6 j	

II. — OBTENTION DES COMPOSES RADIOACTIFS NECESSAIRES A L'EXPLORATION DE LA FONCTION THYROIDIENNE

A) LES TRACEURS SIMPLES.

Les radio-éléments à l'état élémentaire ou ionisé sont obtenus artificiellement, en général par irradiation de cibles par des neutrons, ou plus rarement par des particules chargées.

Seuls, des centres nucléaires peuvent produire ces radio-éléments qui nécessitent des générateurs de neutrons, des accélérateurs de particules et une technologie particulière d'isolement et de purification.

B) SYNTHÈSE CHIMIQUE.

C'est une application pure et simple de la chimie organique, à laquelle s'ajoute les problèmes propres à la radioactivité.

Exemples :

— Baraud et Genevoix (10, 83) ont pu facilement fixer, avec des conditions de pH définies, un ou deux atomes d'iode sur la tyrosine ; ils utilisent cette réaction en dosimétrie.

— Pour la tyrosine, par contre, il est nécessaire de partir d'un composé préalablement halogéné, si l'on veut obtenir une fixation en 3,5, la réaction de substitution directe conduisant à une fixation en 3',5', (242).

La préparation des L,DL et D triiodothyronine (95, 96) à partir de la 3,5 diiodo-L-thyronine, est menée à bien par simple halogénéation en milieu ammoniacal concentré. La purification se faisant par chromatographie sur colonne de Kieselguhr.

Il s'agit, comme on le voit, de réactions de substitution d'un halogène radioactif sur un noyau aromatique.

C) BIOSYNTHÈSE.

Il est parfois difficile de réaliser la synthèse chimique de certaines molécules complexes. On demande alors à des préparations enzymatiques ou à des processus métaboliques d'organismes vivants la biosynthèse de ces molécules. Ces produits nécessitent le plus souvent une séparation puis une purification délicate.

Exemples :

Albright et Coll. (2) proposent une méthode de transformation *in vitro* de la thyroxine en triiodothyronine, par des coupes de rein.

Keston (136) réalise une iodation biologique d'acides aminés et de molécules peptidiques par réactions enzymatiques.

Pour notre expérimentation, nous avons utilisé la biosynthèse des hormones thyroïdiennes par injection à l'animal d'iodure minéral radioactif. A partir de l'iode radioactif, l'animal biosynthétise des acides aminés iodés (M.I.T., D.I.T.) et des hormones (thyronines) liés à

des polypeptides et en particulier à la thyroglobuline. Nous reviendrons sur cet aspect.

Radio-synthèse.

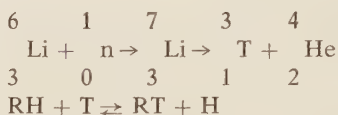
Ces techniques font appel :

1°) à l'action de particules chargées ou neutres ;

2°) à la fission nucléaire ou au recul nucléaire (effet Szilard-Chalmers).

Les marquages obtenus ne sont pas spécifiques et les dégradations moléculaires sont importantes.

Exemple :



Cette dernière réaction nous amène à parler des échanges isotopiques.

E) ECHANGES ISOTOPIQUES.

Dès 1938, Hugues (118) étudie un mécanisme d'échange entre ^{127}I et ^{131}I sur ICH 3.

Cette méthode consiste à remplacer un atome par son isotope radioactif intervenant sous une forme chimique différente. Sue (272) en 1941 semble penser le premier à inclure un atome d' ^{131}I dans une molécule de thyroxine. Il échoue partiellement, les conditions expérimentales n'étant pas satisfaisantes.

Un certain nombre d'auteurs ont réétudié cette technique (8, 74, 85, 145, 178, 283). Ils constatent l'augmentation du rendement en présence de I_2 qui se comporte alors comme catalyseur.

D'autre part, Gleason dira que « la distribution de la radioactivité suit le rapport des concentrations moléculaires des composés ».

Enfin, il ne faut pas se trouver en milieu réducteur.

Mounier propose une méthode élégante par les ultrasons, d'oxydation contrôlée (187).

Exemples :



F) PURIFICATION ET CONTROLE ANALYTIQUE DES COMPOSÉS RADIOACTIFS IODÉS.

Le contrôle peut porter sur trois points :

- caractères chimiques,
- caractères physico-chimiques,
- constantes physiques :

- période du rayonnement,
- spectre d'énergie, etc.

Les purifications font surtout appel à toutes les modalités de chromatographie et à l'électrophorèse.

III. — LES DETECTEURS DE PARTICULES UTILISES POUR LES ISOTOPES RADIOACTIFS DE L'127 I ET PLUS PARTICULIEREMENT L'IODE 131

Les détecteurs, étant donné l'énergie des β et des photons émis par l'131 I (0,36 Mev ; 0,61 Mev) sont basés :

- soit sur le principe d'ionisation des gaz (compteur Geiger Muller) ;

- soit sur le phénomène d'activation (compteur à scintillations)

De très nombreuses études théoriques ou techniques s'y rapportent (8, 15, 20, 21, 22, 23, 52, 62, 81, 88, 100, 124, 248, 249, 250, 254, 257, 297, 300).

A) DÉTECTEURS A IONISATION DANS LES GAZ.

Il comprend :

- un détecteur,
- une alimentation haute tension,
- un intégrateur et un enregistreur, ou, une échelle de comptage.

Le détecteur le plus souvent employé est un compteur Geiger-Muller, parfois un compteur proportionnel.

La tension appliquée s'échelonne suivant les compteurs, de 300 à 1 700 volts.

Le nombre d'impulsions en fonction de la tension, passe par un palier. Cette dernière n'intervient pratiquement pas. Ce sera la zone idéale de mesure du nombre d'impulsions.

Le rendement de comptage varie suivant les particules ionisantes. 100 % pour les α ; 95 % pour les β ; < 3 % pour les γ .

Le compteur n'enregistre qu'une partie des événements. Cette activité apparente est mesurée en impulsions par unité de temps et peut être reliée, en première approximation, à l'activité réelle par la relation :

$$N = N_0 \frac{\alpha \rho}{4 \pi}$$

N = nombre d'événements mesurés,

N_0 = nombre d'événements réels,

α = angle solide,

ρ = rendement du compteur par le rayonnement considéré.

Le coefficient ρ qui caractérise la sensibilité de l'appareil est fonction de l'auto-absorption, de l'absorption par la fenêtre et par le milieu traversé, de la diffusion par ce même milieu, de la rétrodiffusion due

au support et du rendement du détecteur, lui-même fonction de la température.

Pour pouvoir interpréter des mesures, il est donc nécessaire que l'appareil soit fidèle et que le manipulateur opère dans des conditions standard de géométrie, de température, etc.

B) DÉTECTEURS A SCINTILLATIONS.

Leur développement a nécessité deux étapes :

- la découverte du phénomène de scintillation du sulfure de zinc activé par du cuivre ou de l'argent, sous l'impact de particules α par Crooks, Elster, Geitel, procédé repris par Rutherford pour visualiser et mesurer le parcours des rayons γ de l'air ;

- la découverte du photomultiplicateur par Zworykin en 1935.

Les détecteurs à scintillations solides les plus souvent utilisés pour la mesure des rayonnements γ de l' ^{131}I , se présentent comme des cristaux de NaI activés au thallium pour lesquels les transitions produites, provoquent une émission photonique de longueur d'onde 4 500 Å.

Il est accolé à un photomultiplicateur au SbCs_3 , dont la photocathode a une sensibilité maximum pour cette longueur d'onde.

Le phénomène se compose de transformations dont les rendements parfois variables sont décomposables successivement en :

- rendement de captation énergétique du scintillateur : il dépend de la nature et des dimensions du cristal. Il est voisin de 1 pour les γ de ^{131}I ;

- rendement de conversion lumineuse du scintillateur : il dépend de la nature du cristal, mais non de l'énergie. Il est $< 0,1$ pour NaI (TL) ;

- rendement optique du scintillateur : il dépend de la transparence du cristal et de la géométrie. Il est $\leq 0,5$;

- rendement de conversion photoélectronique de la photocathode : il est environ de 0,1 ;

- rendement de collection de la première dynode : il est au mieux voisin de 1 ;

- gain du photomultiplicateur : il dépend du coefficient d'émission secondaire et du nombre de dynodes. Il est de l'ordre de 10^7 .

En travaillant dans des conditions expérimentales bien définies, en particulier de géométrie et de tension, on peut considérer que l'impulsion est proportionnelle à l'énergie de la particule incidente.

Ce détecteur présente sur le compteur Geiger-Muller les avantages suivants :

- proportionnalité,
- facilité d'emploi,
- brièveté du temps mort,
- efficacité de captation.

Nous avons utilisé, pour notre expérimentation, ce type de compteur.

CHAPITRE II

RAPPELS SUR LE MÉTABOLISME THYROÏDIEN

— En 1896, Baumann (13) met en évidence la présence de l'iode dans la thyroïde.

— En 1915, Kendall (131) découvre la thyroxine, principe iodé actif.

— En 1926, Harrington (103) détermine sa structure chimique.

Ce sont trois étapes essentielles dans la connaissance du métabolisme thyroïdien.

Depuis lors, il a pu être précisé, en particulier par l'utilisation de l'iode radioactif.

Un très grand nombre d'articles synthétiques, de revues, de thèses, ont été, ces dernières années, consacrés au développement de la biochimie thyroïdienne (17, 19, 47, 84, 90, 104, 142, 143, 144, 155, 173, 200, 221, 223, 224, 225, 226, 227, 229, 288, 297, 298, 302, 303, 310).

Au stade actuel des connaissances de ce métabolisme, on peut le présenter schématiquement de la façon suivante :

I. — BIOSYNTHESE ET LIBERATION DES HORMONES THYROÏDIENNES

CAPTATION DES IODURES.

Absorbés au niveau du tube digestif, les iodures apparaissent dans la circulation où ils subissent une diffusion dans les liquides extracellulaires et une concentration sélective au niveau des cellules thyroïdiennes.

OXYDATION DE L'IODE.

L'iode est oxydé par action des peroxydases des cellules épithéliales du follicule (4).

FORMATION DES IODOTYROSINES : MIT ET DIT.

L'iode élémentaire se fixe sur les radicaux tyrosiles des polypeptides de la thyroglobuline pour former MIT et DIT (4).

FORMATION DES IODOTHYRONINES : T_4 - T_3 .

La condensation des iodotyrosines, probablement par intervention des peroxydases, (244) leur donne naissance.

LIBÉRATION DES HORMONES THYROIDIENNES.

La thyroglobuline est un support intrathyroïdien inactif. Les iodothyronines sont déversées dans le sang par protéolyse enzymatique.

DÉSHALOGÉNATION DES IODOTYROSINES.

Une désiodase spécifique agit sur la MIT et la DIT libérées lors de la protéolyse de la thyroglobuline. L'iode est alors recyclée (45). La MIT et la DIT ne passent pas normalement dans la circulation.

II. — TRANSPORT DES HORMONES THYROIDIENNES CIRCULANTES

Le rôle de vecteur est essentiellement tenu par une globuline spécifique appelée par les auteurs anglo-saxons « Thyroxin-binding-globulin » (T.B.G.) (86, 146, 121, 212). C'est une glucoprotéine qui migre à l'électrophorèse entre les α_1 et les α_2 globulines. Il s'établit un équilibre entre hormones libres et liées (T.B.G. extra ou intra cellulaire) (274, 275). Au-delà d'un taux de saturation, il y a fixation sur les albumines et préalbumines (T.B.A.) et (T.B.P.A.). La T_3 est plus facilement déplacée de la T.B.G. que la T_4 (211), ce qui a fait admettre la T_3 , par certains auteurs, comme l'hormone active (4).

III. — CATABOLISME DES HORMONES THYROIDIENNES

Il est représenté par trois mécanismes principaux :

A) DÉSHALOGÉNATION.

Processus intense surtout au niveau de la cellule hépatique et rénale, elle aboutit à la formation de thyronines, d'iodures, et d'une partie de la T_3 circulante.

D'autre part, au niveau de la glande thyroïde, ce phénomène est catalysé par un enzyme spécifique désiodant les iodotyrosines (231, 238).

B) DÉSAMINATION OXYDATIVE.

Elle conduit à la formation de dérivés acétiques et propioniques, à leur tour déshalogénés. Roche, Michel, Jouan et Wolf (234) ont montré l'importance de ces deux phénomènes au niveau du rein.

C) CONJUGAISON.

Il y a sulfoconjugaison de la T_3 et de ses dérivés (230) et glycuconjugaison de la T_3 et de la T_4 , au niveau du foie (281).

Le foie joue donc un rôle essentiel au cours du catabolisme des hormones thyroïdiennes (280).

Le rein est le siège d'une désiodation intense et il réalise dans l'ensemble les mêmes réactions que le foie (79, 91, 208).

IV. — REGULATION DE LA FONCTION THYROIDIENNE

La régulation de la fonction (201) thyroïdienne est attribuée aux cellules basophiles delta de l'adénohypophyse, par l'intermédiaire d'une glucoprotéine : la thyroestimuline (T.S.H.). La sécrétion de la TSH subit elle-même une régulation périphérique, homéostatique, et une régulation centrale, d'origine hypothalamique (87, 110).

Un ouvrage intitulé « Hypothalamus et thyroïde » écrit par Blanquet-Meyniel-Croizet-Moura, vient d'être publié aux éditions Villars. Il fait le point de nos connaissances actuelles dans ce domaine.

CHAPITRE III

LES TECHNIQUES DE SÉPARATION ET D'IDENTIFICATION DES ACIDES AMINES IODÉS

La multitude des méthodes de séparation des composés thyroïdiens est déjà en soi la preuve de l'importance qu'attache le chercheur, le biologiste et le clinicien à la connaissance qualitative et quantitative de ces hormones.

Nous avons essayé d'établir un répertoire des méthodes offertes, faire leur critique, définir leurs limites et par là même tenter de trouver la plus propre à donner satisfaction tant sur le plan théorique que sur le plan pratique.

I. — ANALYSE CHIMIQUE

Les méthodes classiques de séparation et d'analyse n'ont apporté que peu d'éléments à la connaissance du métabolisme thyroïdien.

Dès 1895 Baumann (12, 13) montre l'existence de substances iodées dans la thyroïde, dont il extrait d'ailleurs avec Roos (14) une protéine iodée au moyen d'un soluté chloruré sodique.

Notons, cependant, en 1926, la découverte de la thyroxine, dérivé tétraiodé de l'ester parahydroxy-phénylique de la tyrosine, par Harington (103). Ce dernier utilise la méthode des dégradations successives. L'année suivante, il en réalise la synthèse.

En 1932, Leland et Foster (150) isolent dans la thyroïde humaine les iodures, la DIT et la T₄.

En 1933-1935, Blau (31, 32) modifie la méthode d'extraction des composés iodés, en utilisant un réactif qui porte encore son nom.

Puis d'autres auteurs (131, 133, 168, 282) tentèrent avec plus ou moins de succès un isolement et une caractérisation chimique des acides aminés iodés du tissu thyroïdien. On décrit une méthode d'obtention

des iodoprotéines par précipitation fractionnée (56) par les phosphates mono et di-potassique et par le sulfate d'ammonium à saturation.

En 1939, Brand et Kassel (41) proposent un dosage de la thyroxine et de la DIT par mesure de l'iode dégagé en milieu acide.

En 1947, Roche et Michel (220) redonnent de l'intérêt au problème en dosant par colorimétrie la thyroxine, la DIT et la MIT.

En 1948, Winikoff et Trikojus (309) emploient le N-Diéthylsulfanilamide pour l'estimation colorimétrique de la thyroxine.

En 1951, des auteurs (11) proposent leur « Flipping Technique » qui est une méthode de dosage du PBI valable en première approximation.

Tel est, rapidement rappelé, l'apport des méthodes chimiques à la connaissance de la biochimie thyroïdienne.

II. — L'ELECTROPHORESE

La constitution même des iodothyronines et des iodotyrosines rend peu propice leur migration sous l'action d'un champ électrique.

Cette technique a cependant permis de montrer la fixation des composés iodés sur les α globulines (86, 145, 146).

Certains auteurs (6, 210) ont tenté de rendre la migration plus forte en employant des colonnes de gel d'amidon ou de Séphadex, et en transformant les iodotyrosines en dérivés dinitro-phénylés (3_H) ou en liant les protéines sériques à des métaux.

Gordon et ses collaborateurs (86) montrent d'autre part l'indissociabilité électrophorétique de la T_4 ajoutée in vitro avec la T_4 naturelle complexée aux protéines plasmatiques.

Enfin, certains auteurs pensent à l'association de la méthode électrophorétique à la dialyse (160) ou à la chromatographie sur papier (138, 160, 233).

Comme nous le constatons, l'électrophorèse n'est cependant pas la technique principale pour l'étude du métabolisme thyroïdien.

III. — IMMUNOLOGIE.

Son développement est chaque jour plus grand, mais il ne semble pas qu'à ce jour de nombreux auteurs l'aient utilisée comme moyen d'investigation du métabolisme thyroïdien.

Lebœuf (149) et Klevit (137) et leurs collaborateurs ont étudié en parallèle le comportement immunologique d'une part, et le dosage des composés thyroïdiens d'autre part, chez les sujets pathologiques.

Nous ne nous sommes que très peu attachés à cet aspect de l'exploration thyroïdienne, mais nous ne pouvions passer sous silence les possibilités immunologiques et leur avenir.

IV. — SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

La chromatographie sur papier, méthode analytique qualitative, a été largement exploitée. Elle reste la méthode qui a permis la caractérisation des hormones thyroïdiennes. Pour la première fois, en 1947, Fink et ses collaborateurs (69) utilisent la chromatographie sur papier pour la séparation des composés iodés d'un hydrolysate de thyroïdes marquées au préalable à l'iode 131.

Par la suite de nombreux auteurs ont expérimenté ou utilisé ce procédé (5, 18, 49, 77, 90, 91, 93, 114, 138, 197, 206, 207, 214, 222, 232, 237, 267, 289, 296, 301, 306, 307, 308), appliqué à la séparation d'acides aminés iodés provenant d'hydrolysate de glande thyroïde ou d'extractat de liquides biologiques.

A) DÉFINITION.

La séparation des constituants de la phase mobile est un phénomène de migration différentielle dû à des partages préférentiels entre phases fixes et phases mobiles, la phase fixe étant supportée par du papier.

B) HISTORIQUE.

En 1944, Consden, Gordon et Martin (50) utilisent comme support de la phase fixe les fibres de cellulose du papier pour séparer des acides aminés non acétylés au préalable. Ils obtiennent des résultats satisfaisants avec un solvant organique, le n-butanol, puis améliorent le processus de partage, en diminuant les phénomènes d'absorption par l'emploi d'un support cellulosique.

C) MODE OPÉRATOIRE.

A l'aide d'une micropipette calibrée, une quantité connue du produit radioactif à analyser est déposée au niveau du repère supérieur. Après séchage, la feuille est placée dans la cuve à chromatographie en présence d'une phase fixe saturant l'atmosphère. Au bout de six heures, on introduit l'éluant dans le récipient supportant le papier. L'élution est poursuivie 18 à 20 heures, de telle sorte que le front du solvant soit à 40 cm de la tache de départ. La révélation est obtenue par contact de la chromatographie séchée avec un film, pendant deux à trois jours.

Cette technique est celle que nous avons utilisée tout au cours de notre expérimentation, dans un but de caractérisation et de contrôle de pureté des composés iodés constituant les pics radioactifs obtenus par passage des hydrolysats thyroïdiens sur différents types de colonnes.

D) RÉVÉLATION DU CHROMATOGRAMME.

La détection peut être chimique ou radioactive. La détection chimique (218-220) ne présente pas de difficultés, si ce n'est la limite de la sensibilité liée à la quantité de substances mises en jeu.

Les réactifs classiques donnent des résultats satisfaisants :

— le réactif de Dumazert et Santoni (63), la technique de Laidlaw (141) ou la mise en évidence par le chlorure de palladium (92) sont utilisés pour les iodures ;

— le réactif de Bowden et Mac Lagan (38) permet la visualisation des dérivés iodés par l'action du sulfate sérique et de l'arsénite de sodium (189). Fletcher et Stanley (72) en modifiant légèrement la technique obtiennent de meilleurs résultats ;

— les corps présentant un noyau phénolique peuvent être révélés par une réaction de diazotation : réactif de Pauly à la sulfanilamide diazotée (2, 55, 181) ;

— la classique révélation par la ninhydrine (50).

Nous avons préféré la détection par ^{131}I . Cette méthode est plus longue, mais elle permet des déterminations très fines des composés souvent à l'état de traces.

E) DISCUSSION SUR LA CHROMATOGRAPHIE PAPIER.

Désirant avant tout contrôler la pureté des produits obtenus par séparation sur différents types de colonne chromatographique, nous avons constaté que la méthode par révélation photographique était de loin la plus favorable pour la caractérisation des produits radioactifs élués.

De nombreux auteurs ont mis au point des techniques expérimentales (151, 189, 265) pour donner à la chromatographie une interprétation quantitative. Il est classique d'évaluer au photomètre l'intensité de la coloration des taches d'un chromatogramme, ou du noircissement d'une autoradiographie. Une autre méthode, enfin, a été couramment employée : la détermination directe au compteur cloche. L'iode 131 , par l'énergie des rayonnements émis, donne en effet la possibilité d'utiliser une grandeur d'accès facile.

Mais cependant cette méthode ne peut être comparable à une mesure de radioactivité dans un cristal puits en continu, ou au recueil des fractions d'élution par chromatographie sur colonne. On ne peut travailler en chromatographie sur papier que sur des microfractions. C'est une méthode qualitativement excellente, quantitativement délicate. Pour être d'un intérêt supérieur à la chromatographie sur papier, il est essentiel qu'une séparation nette et totale des composés étudiés soit réalisée par la chromatographie sur colonne. C'est en fin de compte, l'objet essentiel de ce travail ; trouver dans l'éventail des techniques de chromatographie sur colonne, celle qui, par sa simplicité, sa rapidité, sa fidélité, donne le maximum de renseignements sur le plan qualitatif et quantitatif.

Cependant, la chromatographie sur papier reste la technique de référence malgré les réserves dont elle est l'objet de la part de certains auteurs. Ces derniers ont étudié les pertes quantitatives de substances en cours de chromatographie (7) et Taurog (277, 278, 279) a

montré, en particulier, l'importance de la désiodation des extraits iodés ^{131}I et de la thyroxine ^{131}I sur le papier à chromatographie lui-même ; ses conclusions ne sont d'ailleurs pas négatives vis-à-vis de cette méthode, mais prouvent la difficulté d'une mesure quantitative et la nécessité d'une correction dans l'interprétation de résultats. L'ensemble des paramètres physiques et chimiques conditionnent l'obtention de résultats quantitatifs rigoureux en chromatographie sur papier de composés iodés. Il a fait l'objet d'un travail expérimental et d'une synthèse importante dans la thèse de Mme G. Gaillard (77).

Du point de vue purification du produit à chromatographier, la méthode nécessite des précautions, qu'il s'agisse de liquides biologiques (sang, lymphe, urine, etc.) ou d'hydrolysats de glande thyroïde. Une délipidation et une purification sont essentielles. L'extraction butanolique préalable est la plus couramment employée (141), mais elle est elle-même génératrice d'artefacts.

F) CONCLUSIONS.

La chromatographie sur papier a permis la caractérisation de la MIT (70, 284, 286), de l'iode (285), de la T_3 (217), de la DIT et de la T_3 (239), de la MIT, de la DIT et de la T_4 (245), la préparation de la MIT et de la DIT (196).

C'est une méthode sûre de référence. Il faut regretter la nécessaire purification du produit de base à étudier, avec les risques de pertes et de transformation qu'elle comporte, la mise en œuvre délicate et longue de la technique elle-même, enfin, la révélation nécessitant un choix entre la rapidité d'exécution et la finesse de la détection. Quelques tentatives d'association de méthodes ont permis un apport de renseignements mais au prix d'une plus grande complexité. Ces techniques sont difficilement utilisables en routine. Citons par exemple : la chromatographie papier associée à une électrophorèse (160), ces deux méthodes pouvant être complétées par une électrodialyse (233) et d'une mesure quantitative par spectrophotométrie (151).

Toutes ces raisons ont provoqué une recherche vers une direction plus favorable.

La chromatographie sur colonne s'est alors imposée comme une méthode donnant plus facilement des résultats quantitatifs et pouvant être utilisée en routine. Nous allons tenter de faire le bilan des méthodes de séparation sur colonne des composés iodés de la thyroïde.

V. — SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE

Nous résumerons d'abord les travaux publiés sur ce sujet. De très nombreuses techniques ont été proposées. Nous utiliserons une classification des méthodes en fonction du support : amidon, silice, Kieselgühr, cellulose, Sephadex, résines, gel de silice (75) (voir tableau n° 2).

1) CHROMATOGRAPHIE DES HORMONES THYROIDIENNES SUR COLONNE D'AMIDON.

L'amidon n'a été que peu employé. Stein et Moore (181, 268, 269), dès 1948, présentent une méthode utilisant l'amidon pour la séparation des acides aminés. Elle sera reprise particulièrement par Rosenberg (245) puis par Dobyns et Barry (58, 59), enfin, plus récemment complétée par une électrophorèse. Les auteurs (6, 137) montrent que la majeure partie de l'extrait salin de glande thyroïde migre avec l'albumine et la pré-albumine et une petite portion seulement avec l' α globuline.

a) *Technique de Rosenberg (245) et de Dobyns et Barry (59).*

Des colonnes de 30 cm de hauteur, 9 cm de diamètre, et dont la base est en verre fritté, sont préparées à partir d'amidon de pomme de terre. Le solvant utilisé par Rosenberg, est composé de 100 ml de n-butanol, 100 ml d'alcool benzylique et 26 ml d'eau, plus 0,5 pour cent de thiodiglycol ajouté au solvant en plusieurs fois. Les colonnes sont mélangées avec de la 8-hydroxyquinoléine et placées sous une pression d'azote de 10 à 12 cm de mercure, de telle sorte que la vitesse d'écoulement soit de 0,8 à 1,2 ml par heure.

Trois cent fractions de 0,50 ml sont recueillies par un collecteur de fractions automatique, immédiatement après avoir déposé l'échantillon sur la colonne. L'éluant est très légèrement différent dans la méthode de Dobyns et Barry, mais ils utilisent également un échantillon d'hydrolysate de glande thyroïde de rat ayant reçu une même dose de 131 I.

Dobyns et Barry utilisent deux solvants. L'un, à caractère acide se compose de n-butanol 100, propanol 100, acide chlorhydrique 0,10 N. L'autre à caractère alcalin, contient n-butanol 100, propanol 100, carbonate de sodium 0,05 N 100. Ils comparent les deux types d'élution.

b) *Résultats et conclusions de Rosenberg.*

L'auteur élue successivement la thyroxine, la DIT et la MIT. Il est satisfait de la reproductibilité et du fort pouvoir de résolution de la colonne d'amidon, pour ces trois corps, mais constate l'échec de la méthode pour la séparation des autres iodothyronines, ce qui hypothèque l'aspect qualitatif.

c) *Résultats et conclusions de Dobyns et Barry.*

Dobyns et Barry ont comparé les deux types d'élution. Leurs conclusions sont identiques à celles de Rosenberg pour l'élution acide. Le caractère acide du solvant conditionne déjà en soi le caractère agressif vis-à-vis d'une molécule iodée, la destruction d'une partie de la thyroxine et des iodotyrosines est très probable.

Par contre, ils sont beaucoup plus optimistes en ce qui concerne la séparation en milieu alcalin. Ils montrent l'importance de la température et la nécessité de la présence de thiosulfate de sodium pour préserver l'intégrité des molécules.

TABLEAU N° 2

phase stationnaire	prise d'essai	phase mobile pour chaque composé séparé					auteurs et références	années	
		peptides iodés	iodures	M I T	D I T	T 3			T 4
AMIDON	Hydrolysat			n-butanol-alcool benzylrique-eau thiodiglycol(1-1-0,26-0,01)				Rosenberg(245)	1951
	Hydrolysat			n-butanol - propanol-HCl0,10N(1-2-1)				Dobyns-Barry (59)	1953
	Hydrolysat			n-butanol - propanol-CO ₃ Na ₂ 0,05M(1-2-1)				Dobyns_BJ.(58)	1953
	Hydrolysat		CHCl ₃ 40% /n-butanol			CHCl ₃ 40%/n-butanol	Grönkvist(89)	1951	
	Hydrolysat		0 à 20% de CHCl ₃ dans du n-butanol					Gross & Co(94)	1952
KIESEL - GÜHR	Hydrolysat					20%CHCl ₃ /n-butanol		Gross & Co(95)	1953
	Hydrolysat		CHCl ₃ 20%/n-butanol (9:1) saturés par la soude	n-propanol (9:1)		CHCl ₃ 20%/n-butanol		Braash_Flock Albert (39)	1955
	Hydrolysat		cyclohexane-butanol(1:9) NaOH 2 N	cyclohexane-butanol(1:9) pur NaOH 2 N à saturation		cyclohexane+butanol(2:8) (3:7)		Kennedy_Purves (134)	1956
	Hydrolysat		CHCl ₃ - butanol - NH ₄ OH (7:4:1)					Toshiro S.(295)	1966
	Hydrolysat			n-butanol-ac.acétique-eau(75:10:15)					Rosenberg(245)
SEPHADEX	Hydrolysat	tampon Tris_HCl 0,05M_pH: 7,4			amylol ammoniacal			Lissitzky (197)	1962
	Sérum			NaOH 0,010 N_pH: 9			Mougey (186)	1963	
	Sérum		acétate de sodium 0,02M pH: 7,3					Mougey (185)	1963
	Standard					NaOH 0,015 N		Makowetz(166)	1966

TAB LEAU N° 2 (suite)

phase stationnaire	prise d'essai	phase mobile pour chaque composé séparé.					auteurs et références	années
		peptides iodés	iodures	M I T	D I T	T ₃	T ₄	
$-N^+(CH_3)_3$ 1 X 2	Hydrolysat	HCl 0,2 N + 37,5 ml / l de butanol	salicylate de Na 0,50 M	HCl 0,2 N + 37,5 ml / l de butanol	HCl 0,2 N + 37,5 ml / l de butanol	eau - éthanol	acide acétique (1_1_3)	Meynild et Co (175) 1958
	Hydrolysat		fixé sur la résine	CH ₃ COOH pH: 3,0	CH ₃ COOH pH: 2,2	C H ₃ C. O O H		Galtonet Co (78 _ 79) 1959
	Standard			acide	formique	de 5 à 88%		Wynn (312) 1959
DOWEX 1 X 8	Hydrolysat	AmOH pH 9	sur la résine	CH ₃ COOH pH 5,8	CH ₃ COOH pH 4,1	C H ₃ C O O H	8 M	Lewallen (154) 1963
	Hydrolysat		sur la résine	H C O O H		HCOOH + Ethanol	60%	Liassitzky (161) 1958
	Hydrolysat			HCOONH ₄ 0,2 N + 30% d' éthanol	pH: 3,5 - 4,5			Lerner (152) 1960
$-SO_3^-$ 50W/X 4	Hydrolysat			élué par gradient : tampon formiate + NH ₄ OH + 30% éthanol				Block (33) 1961
	Standard			HCOONH ₄ pH 4,5 + 30% éthanol		id. pH 9,2 + 30% éthanol		Reilly (209) 1961

METHODE AVEC 2 PHASES STATIONNAIRES: 1X2 + 50WX2

phase mobile	prise d'essai	phase fixe	pour chaque composé séparé	
Cl Na 9 g/l	Plasma	filtrat: F ₂	1X2: F ₁	filtrat: F ₂
				50WX2: F ₃
				Blanquet (30) 1960

Dans la même publication, ils démontrent la présence de deux composés iodés inconnus. Les corps élués sont dans l'ordre : la thyroxine ; immédiatement après l'un des corps inconnus (que les auteurs identifient à la T_3) puis la MIT, la DIT et la seconde substance inconnue.

d) *Conclusions.*

En conclusion, les méthodes de séparation sur colonne d'amidon n'ont pas apporté à leurs auteurs les résultats escomptés et il semble bien que l'amidon ne soit pas le support chromatographique idéal. Nous avons en conséquence, jugé inutile la comparaison de ces méthodes avec les techniques plus élaborées qui nous étaient proposées.

Elles doivent cependant être citées, leur apport n'étant pas négligeable, malgré les réserves émises par leurs auteurs et leur relative difficulté de mise en œuvre.

2) CHROMATOGRAPHIE DES HORMONES THYROIDIENNES SUR COLONNE DE KIESELGUHR.

— En 1951, Gronkvist et Helberg (89) réalisent la première séparation d'acides aminés iodés sur colonne de Kieselgühr. Le Kieselgühr est traité par la soude 0,5 N, l'éluant étant constitué par du chloroforme à 40 % dans du n-butanol. Ils obtiennent une séparation de la thyroxine, de la triiodothyronine et de l'iode minéral.

— L'année suivante, Gross et Martin (94) éluent un hydrolysât thyroïdien avec un solvant dont la composition varie de 0 à 20 pour cent de chloroforme dans le n-butanol. Ils ont une séparation comparable à celle de Gronkvist mais différencient très imparfaitement la MIT et la DIT.

— En 1953, Gross et Pitt-Rivers (95) utilisent une colonne de Kieselgühr pour isoler la 3,5,3' triiodothyronine, en l'éluant par du chloroforme à 20 % dans le n-butanol, en milieu sodique à 0,5 N. Ils procèdent au préalable à une cristallisation, éliminant la DIT et partiellement la thyroxine.

a) *Méthode.*

Pour cette séparation, le Kieselgühr est chauffé pendant 4 heures entre 400 et 500°. Après refroidissement, la poudre est mélangée à un grand volume de HCl 6N et abandonnée pendant 12 heures. L'acide est décanté et le résidu est lavé à l'eau jusqu'à neutralité.

Pour préparer la colonne, 50 g du Kieselgühr ainsi traité sont mélangés à 40 ml de soude 0,5N ; on ajoute ensuite du chloroforme saturé de NaOH 0,5N, puis on procède à un dégazage. La suspension est tassée dans une colonne de 3 cm de diamètre intérieur et de 65 cm de long. Du n-butanol dégazé, contenant 20 % de $CHCl_3$ équilibré par de la soude 0,5N, est passé à travers la colonne. Le mélange dans la soude 0,5N est déposé au sommet de la colonne jusqu'à une hauteur

de 15 cm. On tasse approximativement 0,3 g d'amiante pour creuset de Goosh sur la première couche. Une autre couche de 5 g de Kieselgühr mélangé avec 4 ml de base saturée en chloroforme à 20 % dans le n-butanol est constituée au-dessus de l'amiante, d'une manière similaire.

L'élution est variable selon les auteurs (voir tableau p. 24). La vitesse d'écoulement est de l'ordre de 1 ml en 5 mn.

Comme on peut le constater, la préparation de la colonne est particulièrement longue et délicate.

b) *Résultats.*

La séparation n'est pas idéale, à la lecture du tableau, on constate une séparation des iodures et des iodothyronines. Braasch, avec une méthode d'élution plus élaborée, utilisant deux types de solvant, arrive à séparer en plus le bloc des iodotyrosines.

L'ordre d'élution est le suivant : T_4 - T_3 - I^- , avec le premier éluant, puis DIT, MIT avec le second.

Les auteurs à partir d'un mélange de produits à l'état pur, récupèrent les corps marqués dans chaque pic, après élution sur Kieselgühr, dans une proportion de 94 %. Ils réalisent d'autre part, une hydrolyse trypsique de tissu thyroïdien humain marqué à l'iode 131. Dans ce cas, ils récupèrent seulement 73 % de thyroxine et 84 % de triiodothyronine. Ils retrouveraient 90 % d'iodotyrosines.

c) *Conclusions.*

Cette méthode a été délaissée en grande partie à cause des difficultés de mise en œuvre et de son élution trop délicate. Les résultats qu'elle donne aussi bien sur le plan qualitatif que sur le plan quantitatif, en font une méthode d'intérêt secondaire.

Toutefois cette méthode a connu un regain d'actualité en 1966, avec des auteurs japonais (258, 295) qui utilisent le Kieselgühr comme phase fixe pour leur technique de chromatographie en couche mince. Dans ce but, ils préparent le Kieselgühr G. par ébullition d'une heure dans trois volumes d'acide chlorhydrique à 10 %. Ils sèchent, lavent, coulent et appliquent sur un support de 20 cm sur 10 cm. Le support est traité par un mélange chloroforme, butanol 28 %, ammoniacal (7 : 4 : 1). La séparation des acides aminés iodés est réalisée par courant ascendant en 45 minutes environ. Les corps sont révélés par pulvérisation d'un réactif à base d'acide arsénieux.

Pour éviter une décomposition trop rapide des produits hormonaux, les auteurs préconisent l'emploi de thio-uracile, Toshiro et Sakurada proposent cette méthode avec l'iode 127. Par contre, Shapiro, présente une technique voisine mais utilisant l'iode 131 et ayant par conséquent une possibilité de révélation par autoradiographie.

Les colonnes de Kieselgühr ont été utilisées pour démontrer la présence de la 3,5,3' triiodothyronine dans le plasma humain (97), et

pour l'étude du métabolisme thyroïdien par perfusion in vitro d'iode radioactif (140).

Le Kieselgühr demeure un support délicat à préparer et dont le pouvoir de séparation est assez faible.

3) CHROMATOGRAPHIE DES HORMONES THYROIDIENNES SUR COLONNE DE DEAE CELLULOSE.

Le succès des méthodes de chromatographie sur papier a conduit à la recherche d'une technique sur colonne chromatographique à partir de la cellulose.

En 1949, Peterson et Reineke (194) proposent une séparation sur colonne de cellulose pulvérisée, des acides aminés présents dans un antibiotique : la circuline.

En 1951, Rosenberg (245, 246) s'inspire de cette méthode et l'adapte à la séparation des composés iodés d'un hydrolysate de glandes thyroïdes.

A l'exclusion d'un auteur espagnol (46) qui étudie l'influence des facteurs physiques sur l'élution d'une colonne de D.E.A.E. cellulose (pH, molarité, types ioniques du tampon, etc.), Rosenberg est le seul, à notre connaissance, qui ait tiré de précieux renseignements par cette méthode.

a) MÉTHODE.

Préparation de l'échantillon

Les thyroïdes de rats ayant reçu par voie intra-péritonéale 30 à 60 micro-curies d'iode 131 sont soumises à une hydrolyse alcaline (NaOH 2N), en présence de vapeur d'eau, pendant dix-huit heures.

Après hydrolyse, le pH est ramené à 3. La solution est extraite trois fois par le n-butanol, puis l'extract est évaporé, le résidu repris trois fois par un solvant n-butanol, acide acétique, eau (15 : 4 : 1), centrifugé. Le surnageant est déposé sur la colonne.

Nous pouvons immédiatement constater l'importance des opérations nécessaires à la constitution de l'échantillon, avec tous les inconvénients qui les accompagnent liés aux transformations et aux pertes quantitatives sans insister sur les dangers de l'hydrolyse alcaline (77).

Préparation de la colonne

Dans des tubes en verre de 60 cm de haut et de 0,95 cm de diamètre, on dépose un tampon de laine de verre dans la partie inférieure finement effilée. Douze grammes de cellulose pulvérisée, lavés au préalable sur un entonnoir de Büchner avec successivement de l'eau, de l'acide chlorhydrique 2N, de l'eau, de l'acétone et de l'éther et ensuite séchés à l'air, sont mélangés avec 75 ml de solvant (n-butanol, acide acétique cristallisable, eau, 75 : 10 : 15).

La colonne est tassée par de l'air comprimé sous une pression de 60 cm de mercure. Après tassement, la colonne doit avoir une hauteur de 50 cm. Cette colonne est ensuite équilibrée par passage de 75 à 100 ml sous une pression de 3 à 5 cm par le solvant. La cellulose est tassée légèrement, puis 100 mg de 8-hydroxyquinoléine dissous dans 2 ml de solvant sont ajoutés sur la colonne. Après passage de 100 ml de solvant, on dépose l'échantillon à la partie supérieure. Il filtre par gravité. Les parois du tube sont rincés par deux fois, avec 0,5 ml de solvant. On branche l'effluent. La vitesse d'écoulement est de l'ordre de 0,8 à 1,0 ml par heure. On monte la colonne au-dessus d'un collecteur de fractions automatiques. On procède ensuite au comptage des échantillons recueillis.

b) RÉSULTATS.

L'analyse de la courbe obtenue à partir du tracé de l'activité des échantillons élués, montre la présence de trois composés distincts, correspondant à la thyroxine, la diiodotyrosine et la monoiodotyrosine. L'absence de distorsion de la courbe et de pics d'activités, autres que les trois mentionnés, montre, d'après Rosenberg, l'absence évidente d'autres composés organiques iodés marqués. L'auteur écrit que les caractéristiques intéressantes de ce type de colonne sont le rendement favorable, une décomposition minime et la facilité de la préparation et de l'élution.

Actuellement, nous ne pouvons pas partager ces conclusions. Le rendement est certes excellent, pour les composés sus-mentionnés, mais la T_3 est éluee avec la thyroxine et les peptides iodés ne sont pas individualisés. La décomposition est importante, la facilité d'exécution très relative.

c) CONCLUSION.

Cette méthode a marqué un pas en avant dans la connaissance du métabolisme thyroïdien. Tombée depuis en désuétude, comme la technique au Kieselgühr, elle est, depuis 1966, de nouveau d'actualité. En effet, Scheldon (259) par la chromatographie sur couche mince, obtient une séparation meilleure que prévu et plus fine des hormones thyroïdiennes.

4) CHROMATOGRAPHIE DES HORMONES THYROIDIENNES SUR COLONNE.

— En 1959, Porath et Flodin (205) étudiaient un fractionnement de substances hydrosolubles sur une colonne dont la phase stationnaire était constituée par un nouveau type de gel. Ce gel est formé par des chaînes hydrophiles en maillons enchevêtrés. Il est dépourvu de groupes ionisés, le caractère polaire étant entièrement dû à la haute teneur en groupement hydroxyl. Bien qu'insoluble dans l'eau, ce gel est cependant doué d'un pouvoir de gonflement considérable. Le fractionnement

dépend essentiellement des différences de taille entre les molécules, bien que d'autres facteurs influent sur le phénomène. La séparation est d'autant meilleure que la différence de taille entre les molécules est grande.

— L'année 1960 marque l'étude de ce nouveau support chromatographique (82-204) et la recherche de ses possibilités dans le domaine de la séparation des composés iodés thyroïdiens.

Gelotte conclut que le Sephadex donne une bonne reproductibilité, car son effet est celui d'un tamis moléculaire. Il témoigne d'une légère absorption des substances aromatiques et hétérocycliques. L'absorption des substances basiques et acides dépend de la force ionique et du pH ; il faut donc un choix approprié des conditions expérimentales. Enfin, le gel de Dextrane ne peut pas donner lieu à une adsorption irréversible. Porath, pour sa part, (204) étudie la séparation des protéines, des peptides, et des acides aminés contenant seulement de petites quantités de groupement carboxyliques.

Il constate que :

— les peptides et les acides aminés basiques progressent plus lentement à travers le gel avec certains solvants basiques, tels que la 1M pyridine, et plus vite avec des solvants acides tels que l'acide acétique 1M. Les acides aminés et les peptides acides se comportent inversement avec les solvants mentionnés ;

— une substitution aromatique a un effet marqué sur la migration. La vitesse des acides aminés dinitrophénylés dépend fortement du tampon utilisé.

Certains auteurs (44-210), emploient cette propriété pour influencer sur le fractionnement.

Pour les autres propriétés, leurs conclusions sont parallèles à celles de Gelotte.

— En 1961, 1962, on utilise le gel de dextrane en association avec le marquage à l'iode 131, pour l'isolement d'une part de l'iode du sérum, liée aux protéines (PBI) et d'autre part, de l'iode minéral.

Les auteurs (265) remarquent que, contrairement aux méthodes de séparation précédemment connues, la méthode au Séphadex convient également au sérum sanguin à teneur en iode extrêmement élevée. D'autre part, le gain de temps et de travail n'est pas négligeable. Cette méthode, moins agressive que l'incinération, donne des valeurs d'iode supérieures, les pertes étant moins importantes (123).

— Enfin, les années 1962-1963, voient l'éclosion de techniques très élaborées. Nous nous trouvons devant deux types de techniques, différenciées par leur phase mobile.

A) TECHNIQUES D'ÉLUTION EN MILIEU BASIQUE.

Mougey et Mason, après l'étude d'un procédé permettant d'extraire les composés iodés par le Butanol (B.E.I.) (185), proposent une méthode

de séparation de certains acides aminés iodés et d'iodures par filtration sur gel (186).

Quatre ans plus tard, Makowetz et ses collaborateurs (166) publient une modification de cette technique.

Stumpf (271) décrit un test simple de détermination du PBI, basé sur un équilibre du sérum pendant quinze minutes avec la 3-5-3'-triiodothyronine.

Technique de Mougey et Mason

On utilise le Sephadex G-25. On prend un poids déterminé de gel sec, on le met dans un bécher et on y ajoute de l'eau distillée en agitant jusqu'à ce qu'une légère suspension soit réalisée. On laisse le mélange au repos puis on décante. Ce processus est répété plusieurs fois pendant 2 heures. Après la dernière décantation, on rajoute un peu d'eau pour obtenir une suspension épaisse. On verse cette suspension immédiatement dans une colonne de verre 400 mm $\times$ 15 mm, contenant 10 ml d'eau distillée, le reste du gel étant transféré dans la colonne avec de l'eau distillée.

La base de la colonne est en verre fritté avec un robinet d'arrêt. On laisse le gel à décanter, robinet fermé, puis ouvert. On passe de l'eau distillée, on tasse la surface supérieure, puis on protège par un disque de papier Whatman n° 1. Il ne doit rester ni air ni craquelures. Avant le processus de séparation, il convient de verser 250 ml d'éluant à une vitesse d'écoulement de 60 ml par heure. On emploie pour cela un vase de Mariotte.

On dépose l'échantillon sur la colonne, robinet fermé. On ouvre alors légèrement le robinet puis on ajoute peu à peu de l'éluant. Alors, l'élution peut commencer. Elle est réalisée avec une vitesse d'écoulement de 13 ml par heure. Des fractions de 2 ml sont collectées. La révélation est colorimétrique. Deux types d'éluants peuvent être utilisés :

- NaOH 0,010N pH 9,0,
- Sodium acétate 0,020 M pH 7,3 ou pH 6,3.

La soude élue séparément et successivement DIT, T₃, T₄, l'acétate de sodium élue KI, MIT, DIT.

Résultats par la technique de Mougey et Mason

La triiodothyronine peut être séparée de la thyroxine. Dans un second temps, le fait important réside dans la séparation sur la même colonne de l'iode inorganique et du bloc des iodotyrosines (MIT et DIT). On peut même avec un éluant moins alcalin séparer suffisamment ces dernières pour une identification qualitative sommaire.

Conclusions

Comme nous le constatons, seule la séparation de la T₃ et de la T₄ du sérum sanguin est vraiment réalisée. La suppression d'entraîneurs et l'isolement des deux acides aminés iodés au cours de la même expérience n'est pas décrite.

Makowetz et ses collaborateurs (166), en 1966, s'occupent d'une séparation complète et d'une détermination quantitative de la T_3 et de la T_4 marquées à l'iode 131. On passe 0,5 ml d'échantillon à travers une colonne de 1 100 mm sur 2,7 mm. L'éluant est la soude à 0,015N. Mais MIT et DIT ne sont toujours pas séparées.

B) TECHNIQUE D'ÉLUTION EN MILIEU NEUTRE : LISSITZKY ET SES COLLABORATEURS (157).

La technique de préparation de la colonne de Sephadex est très comparable à celle antérieurement décrite.

Le premier éluant est un tampon tris (hydroxyméthyl) aminométhane-HCl 0,05 M à pH 7,4. La vitesse d'écoulement réglée par un vase de Mariotte est de 1 ml par minute, les fractions collectées sont de 2 ml.

Le second éluant est le tert-amylol saturé de NH_4OH 2N.

Les mesures de radioactivité sont réalisées au cristal puits de NaI activé au thallium.

Les expériences ont été réalisées sur des hydrolysats de thyroïdes de rats mâles de 200 g, sacrifiés 48 heures après injection intrapéritonéale de 60 μ curies de Na 131 I sans entraîneur. L'hydrolyse est réalisée pendant vingt-quatre heures par la pancréatine à pH = 8,6, en présence de thiouracile, selon la méthode de Tong et Chaikoff (290).

On place 1 ml d'hydrolysat pancréatique sur une colonne de Sephadex de 2×48 cm, équilibrée avec un tampon tris-HCl 0,05N de pH = 7,4. L'élution est conduite avec le même tampon.

Le premier pic correspond à de la thyroglobuline non ou incomplètement hydrolysée, les pics suivants, à l'iodure, la MIT et la DIT. La T_4 et la T_3 sont retenues et peuvent être éluées par l'amylol ammoniacal. Les auteurs constatent une bonne concordance entre les résultats fournis par cette méthode et la chromatographie sur papier, en butanol acétique (pour I^- , MIT, DIT) et en amylol ammoniacal (pour T_3 , T_4).

Conclusions

Cette méthode est celle qui semble donner le plus de résultats avec pour phase stationnaire le gel de dextrane. C'est donc celle que nous avons choisie pour notre expérimentation, comme étant la plus intéressante par comparaison avec d'autres types de méthodes.

L'année suivante, Lissitzky et Bismuth (156), proposent une méthode pour l'analyse quantitative de la L-thyroxine et de la 3,5,3' triiodo L-thyronine marquées par l'iode 131, du sérum sanguin.

Une digestion partielle est réalisée par la papaïne. La T_4 et la T_3 sont retenues par la méthode précédente sur Sephadex, puis éluées ultérieurement, elles sont extraites par l'ammoniaque en phase alcoolique.

Enfin, une chromatographie papier est effectuée, à partir de la phase ammoniacale (la phase alcoolique contient les lipides et les pigments).

c) *Discussion.*

Cette méthode a été expérimentée (57), automatisée (128), utilisée pour la séparation des différents composés (184) et critiquée. En effet, Hocman (117) étudie les causes d'erreur provenant de l'utilisation du Séphadex pour la chromatographie de composés contenant de la thyroxine. Il considère les erreurs dues aux propriétés chimiques propres à la tyrosine et au Séphadex. Il étudie successivement la déshalogénéation spontanée de la thyroxine, les effets de la forme et de la taille de la colonne sur les proportions relatives de substances séparées, l'effet de l'adsorption de la thyroxine libre sur le Séphadex, de son élution et enfin les erreurs propres à la méthode.

Cette méthode n'en reste pas moins la meilleure réalisée sur Séphadex. Comme pour le Kieselgühr et la cellulose, des auteurs (210) proposent une technique plus complexe, portant sur des dérivés dinitrophénylés, marqués au tritium, soumis à une chromatographie en couche mince et à une électrophorèse sur Séphadex. Cette technique, intéressante par ses résultats est néanmoins inapplicable en routine.

En choisissant pour notre expérimentation la méthode de Lissitzky, nous pensons avoir réellement utilisé la technique la plus élaborée qui ait été réalisée avec ce support.

5) CHROMATOGRAPHIE DES HORMONES THYROIDIENNES SUR RESINES ECHANGEUSES D'IONS

Les résines échangeuses d'ions ont suscité dès leur découverte un immense intérêt. Leur multiplicité, leurs qualités, leurs possibilités, leurs propriétés physico-chimiques ont ouvert aux chercheurs un vaste champ d'investigation. La recherche dans le domaine de l'exploration thyroïdienne n'a pas fait exception à la règle. Il nous paraît donc nécessaire de faire le point sur les nombreuses méthodes qui nous sont proposées et a priori sur les résines elles-mêmes.

A) LES RÉSINES ÉCHANGEUSES D'IONS UTILISÉES POUR LA SÉPARATION DES HORMONES THYROIDIENNES.

1) *Nature des résines (294)*

Une résine échangeuse d'ions est constituée d'un réseau tridimensionnel de haut polymère, le plus souvent du polystyrène, sur lequel sont greffés des groupements fonctionnels ionisés ou ionisables, qui lui confèrent la propriété d'échangeuse d'ions.

Les résines sont dites échangeuses de cations quand le groupement fonctionnel est un anion, par exemple un sulfonate $-\text{SO}_3^-$.

Les résines sont échangeuses d'anions quand le groupement fonctionnel est un cation, par exemple un ammonium quaternaire $-\text{N}^+\text{R}_3$ ou $-\text{N}(\text{R}'\text{OH})\text{R}_3$.

Schématiquement, leur préparation se réalise en trois temps :

— constitution de chaînes polymérisées de styrène ;

— introduction du divinyl benzène, constituant des « ponts » entre les chaînes. Plus son pourcentage est important, plus les mailles sont serrées : c'est le « taux de pontage ». Il est désigné par la lettre x suivi du pourcentage ($\times 10$ équivaut à dix pour cent de divinylbenzène);

— fixation du groupement fonctionnel par sulfonation ou par chlorométhylation suivie d'une amination.

Les résines échangeuses de cations se présentent sous forme d'acides (p.e. sulfonique) ou de leurs sels.

Les résines échangeuses d'anions sont des bases libres (amines tertiaires) ou des hydroxydes (ammonium quaternaires) ou bien leurs sels.

2) Propriétés des résines

a) Le gonflement et l'ionisation.

Les résines sont pratiquement insolubles dans l'eau, mais la laissent pénétrer. De plus, les molécules d'eau solvatent les groupements sulfoniques (acides forts) et provoquent une ionisation totale en $^{-}\text{SO}_3$ et H^+ . Les forces électrostatiques exercées par les groupements fonctionnels fixes retiennent les protons libres, à l'intérieur du grain, l'eau extérieure n'est donc pas acide. Le gonflement dépend du taux de pontage et de la nature des groupements fonctionnels, c'est-à-dire de la capacité d'échange.

b) La capacité d'échange.

Elle correspond au nombre de groupements fonctionnels. C'est le nombre d'équivalents ioniques par unité de quantité de résine, exprimé par exemple en équivalents grammes par kg de résine sèche (voir tableau n° 3).

c) L'échange d'eau.

En présence de solution ionique, deux phénomènes simultanés peuvent se produire :

1°) L'ion « libre » est différent de l'ion en solution de même signe : il y a échange, celui-ci dépendant des groupements fonctionnels.

2°) Une partie de l'électrolyte (anions et cations) ou les molécules non électrolytes, pénètrent à l'intérieur de la résine. Ce phénomène de pénétration est généralement dénommé : « équilibre de Donnan » (voir tableau n° 3).

Influence de l'ionisation de la résine :

— *Pour les solutés ioniques.* La pénétration de l'électrolyte fort est toujours faible pour les résines qui nous intéressent.

— *Pour les solutés non ioniques.* Si la résine est ionisée, la pénétration est plus importante. Pour une résine non ionisée, elle est voisine de celle des électrolytes forts.

Influence du taux de pontage :

La pénétration est inversement proportionnelle au taux de pontage.

Nature du soluté :

Elle intervient légèrement.

d) Vitesse d'établissement des équilibres.

Elle dépend surtout de la dimension des grains de résine (elle est d'autant plus grande que le grain est plus petit) et des constantes de diffusion. Ces dernières dépendent essentiellement de la dimension des mailles, c'est-à-dire du taux de pontage : plus ce taux est grand, plus la vitesse diminue.

Ce phénomène est très important sur le plan pratique. En effet, on aura des séparations plus rapides sur des résines du type X2 par exemple.

e) Influence des réactions chimiques.

Elle est rare dans les cas qui nous intéressent. Il convient toutefois de noter :

— les affinités apparentes d'une résine échangeuse de cations en présence de réactifs complexants ;

— la fixation d'éléments métalliques dans les résines échangeuses d'anions en présence d'anions complexants ;

— la fixation de molécules dans les résines échangeuses d'ions, par formation de complexes avec un ion contenu dans la résine.

f) Remarque.

L'emploi de solvants autre que l'eau permet d'étendre encore le champ de possibilités par suite des variations des propriétés propres de la résine et surtout parce que les propriétés chimiques des solutés varient parfois considérablement, accroissant les possibilités dont il est fait mention au paragraphe précédent.

3) Application des résines à des fins analytiques.

Le développement par élution

a) Choix de la résine.

Il convient de choisir des résines dites de « qualité analytique ». Suivant les besoins, on peut choisir un taux de pontage plus ou moins fort. Les résines à grains sphériques seront toujours utilisées.

La conservation sous forme sèche est préférable. Les résines ammonium quaternaires de conservation délicate à long terme, ne seront pas stockées sous forme d'hydroxydes.

b) Prétraitement.

Des lavages à l'alcool, puis à l'acide chlorhydrique concentré (3 à 4 M), enfin, à l'eau pure, sont conseillés.

c) Constitution des colonnes.

La colonne doit être obturée par des fibres inertes, type « laine de verre », (éviter l'usage du verre fritté), thermostatée si possible.

Au remplissage, il faut éviter les bulles d'air et une sédimentation sélective des grains (agitation permanente au cours de la sédimentation). La résine doit être tassée uniformément (technique du cycle d'échange, par exemple $\text{—H}^+\text{—Ca}_2^+$ pour les résines —SO_3^-).

Il est recommandé de couvrir le sommet de la colonne de résine par un disque de papier Whatman, pour éviter les turbulences de surface.

d) Développement par élution.

La solution de développement est dénommée éluant. La courbe de répartition de concentration des ions ou des molécules élués à leur apparition dans l'effluent, est appelée « courbe d'élution ».

La courbe d'élution est régie par certaines lois.

— Détermination du volume nécessaire à l'élution d'un corps A.

Le volume VA nécessaire à l'élution d'un composé A, est proportionnel à la masse m_o de résine contenue dans la colonne et à la force PA avec laquelle le produit A est fixé dans la résine, ou, coefficient de partage. Il est par ailleurs forcément supérieur au volume interstitiel Vi de la colonne, (ce volume Vi est celui qui serait nécessaire pour faire apparaître un produit qui ne serait pas du tout fixé : $P_o = 0$). On peut écrire la relation :

$$VA = Vi + m_o PA$$

— Longueur de la colonne.

Le volume est donc proportionnel à la longueur de la colonne. L'étalement de la bande éluee augmente avec cette longueur. La concentration maximale est inversement proportionnelle à la racine carrée de la longueur, ce qui se traduit par un tassement des pics.

— Importance de l'éluant.

L'élution dépend de la différence d'affinité entre l'ion élué et l'ion éluant, ainsi que de la concentration de celui-ci.

Le coefficient de partage est d'autant plus grand que la solution éluante est plus diluée, d'une part, et que l'affinité de la résine pour l'ion éluant est plus petite d'autre part.

— Conclusions.

Ces lois générales ne sont pas toujours parfaitement vérifiées dans la pratique, en particulier lorsque l'un des facteurs n'est pas respecté (par exemple, la concentration de l'ion qui varie en cours d'expérience entraîne une asymétrie de la courbe d'élution). Il conviendra donc de bien choisir la résine, l'éluant ou les éluants. En effet, on peut procéder à une élution par gradient de concentration ou avec des éluants différents et appropriés au corps que l'on désire « décrocher » de la résine. Nous pensons que toutes ces notions très générales étaient nécessaires pour la bonne compréhension de la partie qui nous intéresse, c'est-à-dire la séparation des hormones thyroïdiennes par les résines échangeuses d'ions (voir tableau n° 3).

TABLEAU N° 3

Résines échangeuses de :	Type	Groupements fonctionnels	Ordre d'échange des ions		Noms commerciaux	I	II	III	Références des utilisateurs pour la séparation des composés iodés :
			Mono.	Divalents					
Cations	polystyrène sulfoné	sulfonate	Ag)Rb)Ca)	Zn)Cu)Ni)	Dowex 50WX2	5,2	H ⁺	0,74	27-30-173-176-177-273-
	copolymère styrené + divinyl benzène sulfoné	-SO ₃ ⁻	K)NH ₄)Na) H)Li	Co	X4 X5 Amberlite/X8 IRA120 X12 KU_2	5,2 5,2 5,1 5 6,0	H ⁺ H ⁺ H ⁺ Na ⁺ H ⁺ H ⁺	0,72 0,80 0,80 0,85 0,83 76	33-152-209. 44. 180 262 115
Anions	polystyrène ammonium quaternaire	-N ⁺ (CH ₃) ₃	I)NO ₃)Br) Cl)HCO ₃) IO ₃)H ₂ COO ⁻ OAcOH) F		Dowex 1X 2 Amberlite X8 IRA-400	3,5 3,2 3	Cl ⁻ Cl ⁻	0,72 0,71	24-26-28-29-43-51-78-79. 111-121-154-122-174-175- 199-203-260-301-307-312. 67-119-161. 179-315.
		-N ⁺ (CH ₃) ₂ C ₂ H ₅ OH	I)NO ₃)Br)Cl OAcOH)OAcF		Dowex 2X10	3	Cl ⁻	0,71	256.

I - Capacité d'échange approximative (Equivalent par kg de résine sèche sous forme H⁺)

II - Forme ionique.

III - Densité

B) TECHNIQUE D'ANALYSES SÉPARATIVES DES HORMONES THYROIDIENNES UTILISANT LES RÉSINES ÉCHANGEUSES D'ANIONS.

Dès 1955, Blanquet et son groupe de recherches proposent une technique utilisant les résines échangeuses d'anions pour la séparation des composés iodés d'un hydrolysât thyroïdien (24-26-28).

L'étude détaillée de la séparation des iodotyrosines et des iodothyronines et des facteurs physico-chimiques d'obtention de cette séparation sur résines ont fait l'objet de la thèse de sciences de Meyniel.

Il apparaît rapidement que si la séparation des monoiodotyrosines, diiodotyrosines et iodures est excellente, la récupération quantitative des thyronines laisse par contre à désirer.

Pitt-Rivers propose dans ce domaine une modification de cette technique de base. Mais alors que la technique initiale permet la chromatographie des composés iodés avec deux éluants, Pitt-Rivers propose leur remplacement par 4 éluants successifs, ce qui allonge de façon importante la manipulation.

Pour tenir compte des remarques de Pitt-Rivers ainsi que les remarques d'autres auteurs (78-79-154-312, etc.) Meyniel, Blanquet et C^o ont repris leur technique initiale en modifiant légèrement le mode d'élution sans allonger la manipulation qui demeure très courte pour une chromatographie de ce type. La méthode standard ainsi codifiée s'établit comme suit :

1) *Méthode sur Dowex 1X2 (200-400 mesh).*

a) *Méthode de Meyniel-Blanquet (174-175).*

La résine anionique Dowex AG1X2 (200-400 mesh) sous forme Cl⁻ est convertie sous forme OH⁻ par une solution d'hydroxyde de sodium 2N ou d'ammoniaque 2N, puis lavée à l'eau distillée, jusqu'à ce que le pH de l'effluent soit de 8,6. On prépare alors des colonnes de 15 cm pour un diamètre de 1,5 cm.

On place au sommet de la colonne de 2 à 5 ml d'un hydrolysât trypsique de glandes thyroïdes de rats ayant reçu une injection de 25 microcuries de Na 131 I 24 heures avant le sacrifice.

La désorption des composés iodés est réalisée au moyen de trois éluants successifs.

Une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (0,20) avec 37,5 ml de n-butanol par litre, permet d'obtenir nettement séparés et dans l'ordre, les peptides iodés, puis la MIT, enfin la DIT.

— Une solution de salicylate de sodium 0,50M élue les iodures.

— Un mélange eau-éthanol absolu-acide acétique cristallisable (1 : 1 : 3) permet la récupération des iodothyronines.

La méthode ainsi décrite s'applique essentiellement aux hydrolysats thyroïdiens, elle a inspiré tout au moins sous sa forme initiale (24-26-28), un certain nombre d'adaptations en particulier pour son application au sang.

b) *Méthodes issues de la précédente.*

1) *Galton et Pitt-Rivers* (78-79). Les composés iodés sont quantitativement élués. La thyroglobuline, la monoiodotyrosine et la diiodotyrosine sont éluées à pH 3,6, 3,0 et 2,2 respectivement. La thyroxine et la triiodothyronine sont éluées à pH 1,4. L'iode minéral reste sur la résine. Les auteurs ont expérimenté cette technique sur un hydrolysât de thyroïde et de rein.

2) *Pitt-Rivers et Suck* (199) élurent par l'acide acétique dilué MIT et DIT et insistent sur la faible dégradation chimique par cette technique.

3) *Ponchon* et ses collaborateurs (203) élurent par un tampon acétate 0,2M pH = 4,5 puis par l'acide acétique à 20 %, pH = 2 et à 50 %, pH = 1,4. Ils n'isolent pas les peptides iodés.

4) *Vigouroux et Jost* (301) présentent une technique intéressante. A partir d'un plasma à pH = 11, ils élurent par l'eau bidistillée les protéines iodées, par CH_3COOH 2,7M les iodotyrosines, par CH_3COOH 10M les iodothyronines, par NaClO_4 3M les iodures.

Les auteurs constatent la présence de protéines iodées dans le plasma de lapin.

5) *Lewallen* (154) utilise l'acétate d'ammonium pour recycler la résine. L'élution est réalisée à pH 9 par l'ammoniaque pour les iodo-protéines, à pH 5,8 pour la MIT, à pH 4,1 pour la DIT. Puis, l'acide acétique 8N élue thyroxine et triiodothyronine. Les iodures minéraux restent sur la résine.

6) *Wynn, Fabrikant, Deiss* (311, 312) proposent un chauffage de la colonne et une élution par l'acide formique à des concentrations variant de 5 à 88 %. Les auteurs élurent dans l'ordre : MIT, DIT, T_2 , T_3 , T_4 .

7) *Ingbar* et ses collaborateurs ont étudié la purification de la thyroxine liée aux protéines comparativement aux fractions de Cohn (122).

2) *Méthode utilisant les résines Dowex 1 X 8
ou Amberlite IRA 400.*

En 1954, *Hurlbert* et ses collaborateurs (119) présentent une méthode de résolution systématique et d'examen des nucléotides. Ils procèdent par chromatographie sur colonne de résine 1X8 par de l'acide formique contenant du formiate d'ammonium.

Quatre ans plus tard, *Lissitzky et Lasry* (161) reprennent la méthode précédente et l'appliquent aux composés thyroïdiens.

Technique de Lissitzky, Lasry sur Dowex 1X8.

La résine Dowex 1X8 est traitée sur la colonne (1 cm $\times$ 25 cm) par du formiate de sodium 3,5M jusqu'à disparition des ions Cl^- libres puis lavée abondamment à l'eau distillée. Les solutions d'acides aminés iodés sont absorbées sur la colonne et celle-ci est lavée à l'eau distillée.

La colonne est alimentée en éluant par un dispositif permettant de passer sous pression des solutions à pH régulièrement croissant.

Cette méthode permet la séparation des groupes de composés suivants à partir d'un hydrolysât de thyroglobuline de rat :

- les iodotyrosines (MIT + DIT),
- les iodothyronines groupées,
- les iodures minéraux restant sur la colonne.

En première analyse, la méthode sépare donc les composés en trois groupes. La présence de peptides iodés n'est pas signalée.

3) Application des résines échangeuses d'anions à l'étude des hormones thyroïdiennes plasmatiques.

a) Méthode de Scott et Reilly sur Dowex 2 X 10 (256).

La méthode est simple. Elle est basée sur l'adsorption de l'iode minéral par une résine échangeuse d'anions. Du sang marqué à l'iode 131 est prélevé sur héparine. La résine Dowex 2 X 10, sous la forme ionique Cl⁻, obtenue par traitement de la forme OH⁻ par une solution de NaCl concentré puis lavage par l'eau distillée, est mise en suspension dans la proportion de 25 %. 1 ml de cette suspension est ajouté à un volume déterminé de plasma (2 à 7 ml). Le mélange plasma résine est agité pendant 3 minutes, puis centrifugé à 1 500 g pendant au moins 5 minutes. Après centrifugation, la résine est rincée avec de l'eau distillée, remise en suspension puis rincée à nouveau. La radioactivité est mesurée au cristal puits. Les auteurs proposent une formule tenant compte de facteurs de correction nécessaires :

$$\frac{C}{S_{00}} = \left(\frac{A - A'}{0,95} \right) \times \frac{100}{B} \times \frac{100}{V}$$

A = activité plasmatique totale.

A' = activité sur la résine.

B = dose en microcurie.

V = vol. plasmatique en ml.

Cette méthode a l'avantage de la facilité, mais les renseignements qu'elle apporte sont vraiment trop rudimentaires pour qu'elle soit efficacement utilisable.

b) Méthodes de Zieve (315) et de Mitchell (179) sur Amberlite I.R.A. 400 et Dowben (61) sur Dowex 1X8.

Zieve n'étant pas totalement satisfait des résultats obtenus par précipitation plasmatique à l'acide trichloracétique (T.C.A.), lavage et mesure de la radioactivité du précipité lavé, propose une séparation sur Amberlite I.R.A. 400.

Il convertit la résine de la forme hydroxyle en forme chlorure, par passage d'acide chlorhydrique N cinq à six fois puis lavage à l'eau distillée. Une colonne de 3 mm de diamètre et de 30 cm de long,

thermostatée à 37°C, est remplie avec de la résine. 10 ml de plasma sont mis à filtrer sur la colonne en 15 mn.

Par cette méthode, les auteurs cherchent seulement à séparer l'iode inorganique, et proposent ainsi une mesure du PBI.

Mitchell et Dowben travaillent dans le même sens. Ils appliquent la méthode à l'exploration thyroïdienne humaine.

Conclusions.

Nous avons pris comme technique de référence la méthode de Meyniel, Blanquet et coll. En effet, c'est celle qui sépare le plus de composés sur support de résine 1X2. Elle avait d'autre part, pour nous, l'avantage d'être pratiquée en « routine » dans le laboratoire.

Elle a de plus, le gros avantage d'être constante dans ses résultats et les pourcentages des différents composés sont très voisins de ceux obtenus par chromatographie sur papier.

C) TECHNIQUES D'ANALYSES SÉPARATIVES DES HORMONES THYROIDIENNES UTILISANT LES RÉSINES ÉCHANGEUSES DE CATIONS.

En regardant le tableau n° 3, nous constatons que les résines ayant un faible coefficient de pontage ont été les plus employées. L'explication en est simple, une résine à mailles peu serrées permettant une séparation plus rapide pour une efficacité à peu près identique sinon supérieure.

Nous allons étudier les résines par taux de « pontage » décroissant et les techniques qui s'y rattachent.

Hirs, Moore, Stein (115) proposent une technique sur 50 X 12, en 1952. Quelques années plus tard, Moore et Stein (180, 262) détaillent une méthode employant une résine Amberlite IR-120. Cette résine est très voisine par ses caractéristiques et ses propriétés, de la Dowex 50 WX8 et utilisée d'ailleurs par les mêmes auteurs (182). Leurs méthodes, assez complexes, étudient la séparation d'acides aminés en fonction d'un certain nombre d'éluants, et en fonction de la taille des particules (101). Leur technique servira de base à Lerner pour l'étude de l'élution des acides aminés iodés. Brown, Ruth et Tampon (44), comparent la séparation de dérivés dinitrophénylés des produits thyroïdiens (MIT, DIT, T₄, etc.) par chromatographie sur papier Whatman n° 4 siliconé, par filtration sur Séphadex G 25 et par élution sur résine Dowex 50WX 5, forme ammonium, obtiennent par cette dernière méthode des résultats encourageants.

Cependant, les auteurs se sont tournés plus volontiers vers une résine à taux de pontage intermédiaire, 50 WX4 en particulier.

1. — Séparation sur Dowex 50 W X 4

a) Technique de Lerner (152).

Un enregistrement en continu de la densité optique à 254 mμ est préconisé. Une colonne de 15 cm de résine Dowex 50 X 4, 30-40 μ est

utilisée. L'effluent à 25 ml par heure passe à travers une cellule de silice où l'absorption est mesurée, puis s'écoule dans un séparateur de fraction.

Les tyrosines iodées sont séparées à pH = 3,5-4,5 avec un tampon formiate d'ammonium 0,2N avec 30 % d'éthanol, dans l'ordre : MIT, DIT.

Après 7 heures (175 ml) un tampon pH 9,2 est utilisé. Il élue successivement la 3,5 diiodotyrosine, la thyroxine et la triiodothyronine. L'élution est totale en 10 heures (250 ml) et la soude 0,2N entraîne les produits restants. La colonne est régénérée par le tampon à pH = 4,5 et elle est alors prête à être réutilisée. Environ 95 % des produits radioactifs de départ sont récupérés.

L'auteur a d'autre part, testé la résine 50WX2. Les résultats sont satisfaisants. Par contre, son essai sur Amberlite IR-120 lui a donné une pauvre résolution des thyronines iodées.

b) *Technique de Block et Mandl (33).*

MÉTHODE

1°) *Digestion des protéines iodées.*

Une prise d'essai d'environ 10 mg est mise en suspension dans 2,5 ml d'un tampon carbonate d'ammonium 0,01 M en solution alcoolique à 10 %, pH 8,4 et on ajoute 0,1 mg d'enzyme P obtenu à partir de streptomyces griseus, dans 0,5 ml de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ alcoolique. La digestion se poursuit pendant 48 heures à 40 °C. On ajoute 1 ml d'éthanol et on amène le volume de la solution à 10 ml avec un tampon au formiate d'ammonium 0,2M, pH = 3,9 dans l'éthanol à 30 %. L'hydrolysate peut être conservé à 4 °C.

2°) *Constitution de la colonne.*

La résine Dowex 50 W X 4 est purifiée par traitements répétés avec de l'acide chlorhydrique 4N et fractionnée par la méthode d'entraînement hydraulique d'Hamilton. On emploie la fraction constituée par les grains de 20 à 30 μ pour constituer une colonne de 0,9 sur 20 cm remplie sous pression. La résine est convertie dans la forme ammonium par l'ammoniaque 1N et ensuite tamponnée par un traitement au formiate d'ammonium 0,20N en solution éthanolique à 30 %, pH = 3,9.

3°) *Elution.*

Un volume de 0,5 à 3,0 ml, contenant de 200 à 1 000 μg de protéines, est déposé sur la colonne. Immédiatement après l'échantillon, on ajoute 0,5 ml de tampon formiate et la solution est entraînée sous pression d'air à travers la colonne. L'espace au-dessus de la résine est toujours soigneusement rempli d'éluant et les acides aminés sont séparés par gradient d'élution. On utilise les solutions suivantes :

- solution A = tampon formiate d'ammonium 0,2M en solution dans l'éthanol à 30 %, pH = 3,9,
- solution B = NH_4OH 0,2N dans l'éthanol à 30 %,
- solution C = NH_4OH 0,5N dans l'éthanol à 30 %.

L'élution est conduite à la vitesse de 0,6 ml par minute, en utilisant successivement :

- 30 ml de A.
- 25 ml de A + 5 ml B.
- 20 ml de A + 10 ml B.
- 15 ml de A + 15 ml B.
- 10 ml de A + 20 ml B.
- 30 ml de B.
- 60 ml de C.

4°) Révélation.

Les auteurs emploient un autoanalyseur « Technicon » avec une révélation colorimétrique par l'arséniate de sodium et le sulfate cérrique, en milieu H_2SO_4 à 60 °C. Le sulfate cérrique est réduit en milieu acide par l'arsénite, la réaction est catalysée par l'iode. Le colorimètre est équipé d'un filtre à 420 m μ . Le degré de décoloration est enregistré en continu.

RÉSULTATS

Sont élués successivement : les iodures, avec le front de l'éluant, la MIT, la DIT, la T₄ et la T₃. Les auteurs observent d'autre part la présence d'un pic de nature indéterminée au cours de l'élution d'un hydrolysât de thyroïde de porc. Ce produit n'apparaît ni après la digestion par l'enzyme P ni après l'action de la Viokase. Il s'agit vraisemblablement d'un peptide iodé. Les auteurs comparent leurs propres résultats quantitatifs à ceux d'autres publications (34, 35, 36, 135, 167, 171, 198, 291, 304, 305, etc.).

Cette méthode nous ayant paru des plus intéressantes, par sa mise en œuvre et son pouvoir de séparation, nous l'avons expérimentée dans notre travail.

c) Technique de Reilly, Searle et Scott (209).

Comme la précédente technique, cette méthode est une adaptation de la méthode de Lerner.

MÉTHODE

La résine Dowex 50X4, 30, 35 μ est mise en suspension dans la soude 1N et ensuite lavée jusqu'à disparition des ions hydroxydes. Puis elle est mise en suspension dans un tampon formiate d'ammonium 0,20N à pH = 4,5. La résine en suspension est versée dans une colonne thermostatée par courant d'eau à 35 °C, de 15 cm de haut, de 1,3 cm de diamètre interne, avec un filtre en verre fritté à la partie basse. Un collecteur de fractions est utilisé à la sortie. Un sérum contenant des acides aminés iodés marqués in vivo par l'iode 131 ou du sérum mis à incuber avec des acides aminés iodés I 131 est amené à pH = 4,5, avec de l'acide formique à 10 %, dans le but de dissocier les acides aminés iodés de leur fixation protéique. Les précipités sont supprimés par

centrifugation et une fraction de sérum est déposée au sommet de la colonne. Le précipité contient moins de 1 % de l'activité : la récupération de fractions de 3 ml commence aussitôt. Le sérum finissant de passer dans la résine, on réalise un lavage par 30 ml de tampon formiate d'ammonium pH = 4,5. Les éluants sont :

1°) Un tampon formiate pH = 4,5 avec 30 % d'éthanol.

2°) Un tampon formiate d'ammonium pH = 9,2, avec 30 % d'éthanol. Le temps nécessaire pour un cycle d'élution est approximativement de 20 heures en recueillant 180 fractions de 3 ml à la vitesse de 0,5 ml/minute. Les mesures radioactives sont faites sur un détecteur à scintillations automatique, muni d'un spectromètre γ .

RÉSULTATS

Les auteurs procèdent à l'analyse à partir de produits standard d'abord séparément pour contrôler l'emplacement des pics d'élution puis mélangé afin de juger du pouvoir séparateur. La pureté radioactive de chaque composé est vérifiée par chromatographie sur papier et autoradiographie.

Avec le front de l'effluent apparaissent les iodures, puis viennent successivement la MIT, la DIT ; au passage du second éluant, la T_4 , la T_3 et la T_2 sont caractérisées successivement. Le rendement est de l'ordre de 86 %.

La technique a été appliquée à la séparation des acides aminés iodés du sérum.

Les résultats obtenus par cette méthode sont très intéressants. La courbe publiée témoigne d'une résolution parfaite. Les auteurs d'autre part, ne signalent pas l'existence d'autres composés que les iodures, les iodotyrosines et les iodothyronines ; la présence de peptides iodés n'est pas mentionnée. Il faut remarquer cependant que l'hydrolyse employée est particulièrement agressive (HCOOH 10 %), ce qui pourrait fournir une explication à l'absence de peptides iodés.

Cette technique fera l'objet de notre expérimentation comparative.

D) TECHNIQUE D'ANALYSE UTILISANT LES RÉSINES ÉCHANGEUSES DE CATIONS ET D'ANIONS POUR LA SÉPARATION DES COMPOSÉS IODÉS PLASMATIQUES.

Blanquet, Meyniel et Savoie (30) en 1960 ont proposé une méthode originale utilisant successivement une résine cationique et une résine anionique.

Méthode de Blanquet, Meyniel et Savoie.

Après administration de 25 μ Ci, on prélève 10 ml de sang sur héparine à la 24^e et la 48^e heure. Deux petites colonnes sont placées l'une au-dessus de l'autre.

— La colonne supérieure contient 1,5 ml de résine cationique Dowex 50 X 2 (200-400 mesh) sous forme H^+ .

— La colonne inférieure renferme 1,5 ml de résine anionique Dowex 1 X 2 (200-400 mesh) sous forme Cl⁻ ou OH⁻.

L'activité P de 2 ml de plasma est déterminée au cristal creux, déposé sur la colonne supérieure et élué par 15 à 20 ml de NaCl à 9 g/l. Trois fractions sont obtenues :

— La fraction F₁, fixée sur la résine anionique 1 X 2, correspond à l'iode minéral du plasma.

— La fraction F₃, fixée sur la résine cationique 50 W X 2, correspond aux iodothyronines libres ou faiblement liées aux protéines plasmatiques vectrices des hormones (TBP) et aux iodotyrosines libres lorsqu'elles sont exceptionnellement présentes dans le plasma. C'est la fraction hormonale.

— La fraction F₂, constituée par le filtrat, est formée de grosses molécules non retenues par les résines. Ce sont les peptides iodés.

Une mesure de l'activité au cristal puits de deux résines est effectuée. La fraction F₂ peut être déterminée par différence, en effet :

$$P = F_1 + F_2 + F_3$$

ou par mesure directe, après précipitation des peptides par l'acide trichloracétique.

L'intérêt de ce test tient dans sa simplicité technique et dans sa facile adaptation aux laboratoires de routine. Elle est de courte durée (deux à trois heures), facile à mettre en œuvre, les examens pouvant se faire en série, sans pour cela que les temps d'analyse soient augmentés proportionnellement.

Enfin, les renseignements fournis, associés à ceux de la cartographie et de la courbe de fixation, permettent d'étayer bien des diagnostics.

Cette méthode a été étudiée (129) parallèlement à l'index globulaire ou rapport H/P et à la mesure des hormones thyroïdiennes susceptibles d'être extraites par le butanol ou BE 131 I. Certains auteurs (177, 273), ont étudié cette technique insistant sur sa simplicité, son innocuité et sur la valeur des renseignements quantitatifs et qualitatifs fournis aux cliniciens. Vrignaud (303) l'applique avec succès au dosage urinaire. Signalons que Miller et coll. (176) ont étudié les rapports étroits existant entre la variation de la fraction F₂ et le traitement des hyperthyroïdies par l'iode radioactif.

Nous voudrions avoir présenté un tableau aussi complet et aussi clair que possible des techniques actuellement utilisées.

Il reste à tester comparativement les méthodes les plus intéressantes par leurs résultats analytiques. C'est ce que nous nous sommes efforcés de réaliser dans la seconde partie de ce travail.

DEUXIÈME PARTIE

CHAPITRE PREMIER

APPAREILLAGE EXPÉRIMENTAL UTILISÉ

Le travail de séparation par colonne de différents composés radio-actifs, est considérablement simplifié, si à chaque instant, on peut savoir où en est l'élution.

Nous avons donc, avec l'aide de Capellani, réalisé le montage décrit ci-après.

Cet appareil (figure n° 1) est conçu de telle sorte qu'il y ait un enregistrement des activités en fonction du temps, et une séparation en fraction de 2 ml. Dans un stade ultérieur, une vérification et une caractérisation par chromatographie monodimensionnelle sur papier, des métabolites iodés séparés, ont servi de contrôle.

A) MATERIEL MECANIQUE

Dans l'ordre de passage des fluides, nous avons :

1°) *Une pression d'azote.*

Elle est réalisée au moyen d'un débit-mètre de précision (type Argon) et d'un manomètre gradué au $1/100^e$ de Bar. Cette pression d'azote nous a permis d'avoir une vitesse d'écoulement constante, la différence de pression due à la variation de la hauteur de l'éluant dans le ballon étant négligeable en regard de la pression exercée. En effet, 10 cm d'eau exercent une pression de 9806,38 dynes/cm² à 4°C et 760 Torr, soit approximativement 10⁴ microbaries.

La pression utilisée pour le gaz est comprise entre 2 et 3 10⁵ microbaries. Le rapport est de 3/100 à 5/100, donc à pression gazeuse constante, la vitesse d'écoulement reste constante, en 1^{re} approximation, quelle que soit la hauteur du liquide.

D'autre part, l'azote, gaz neutre, ne réagit pas sur les éluants.

2°) *Une colonne de verre.*

Elle peut être thermostatée. Ses dimensions varient selon les expé-

riences, les séparations demandant des quantités plus ou moins importantes de support de chromatographie (résines échangeuses d'ions, gel de Dextrane, etc.). La partie inférieure est obstruée par un tampon de laine de verre.

3°) *Un tube cylindrique en verre.*

Il mesure deux centimètres de hauteur intérieure et ses dimensions correspondent à celles du cristal creux de la sonde utilisée. Une tubulure, descendant à 2 mm du fond permet l'arrivée du liquide. Une tubulure haute favorise l'évacuation. Ce système nous a donné satisfaction.

4°) *Un séparateur de fractions.*

Nous avons utilisé pour séparer en fractions de 2 ml, un système à siphon (Pleuger) qui permet une bonne régularité de fractionnement. Un système électronique permet la rotation d'un plateau porte tubes pendant le remplissage du siphon. Nous pouvions au choix utiliser deux systèmes, suivant la conduction électrique des liquides fractionnés.

B) APPAREILLAGE ELECTRONIQUE

Nous avons utilisé un détecteur à scintillations.

1) *La sonde à scintillations.*

Elle se compose essentiellement d'un cristal scintillant accolé par une pâte spéciale à base de silicones, à un photomultiplicateur, lui-même suivi d'un préamplificateur.

Le cristal d'iodure de sodium activé au thallium réagit en présence de l'énergie dissipée par la radiation.

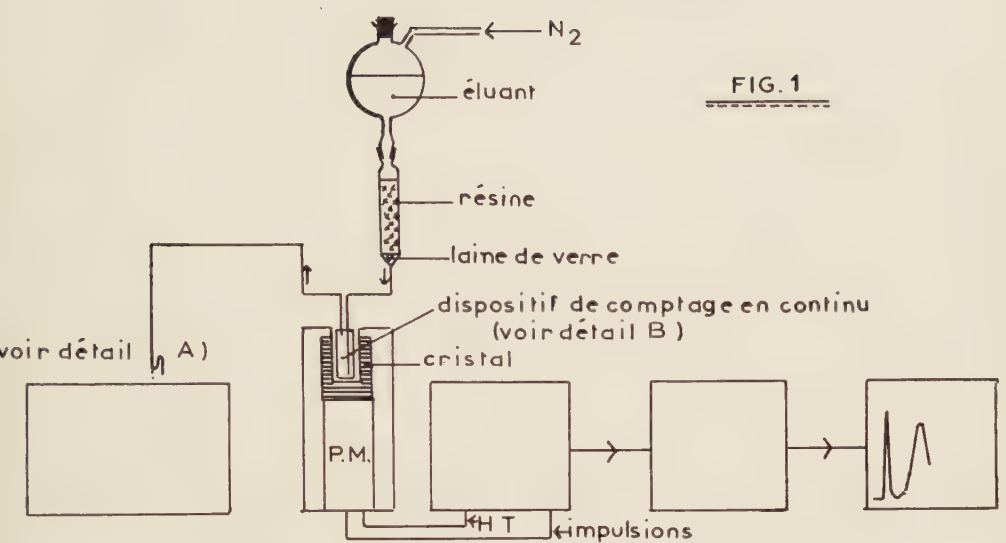
L'impureté, en l'occurrence, le thallium, capte les trous positifs, les électrons les repoignent et les annulent. Ce phénomène s'accompagne d'une émission photonique dans le bleu proche (4 500 Å) correspondant à la sensibilité maximum de la photo-cathode au SbCS_3 du photomultiplicateur.

Par effet photoélectrique, les photons émis par le cristal donnent naissance à des électrons de faible énergie attirés par la première dynode à potentiel positif, créant ainsi une émission secondaire plus importante et ainsi de suite. L'avalanche électronique qui en résulte, crée ainsi une impulsion électrique.

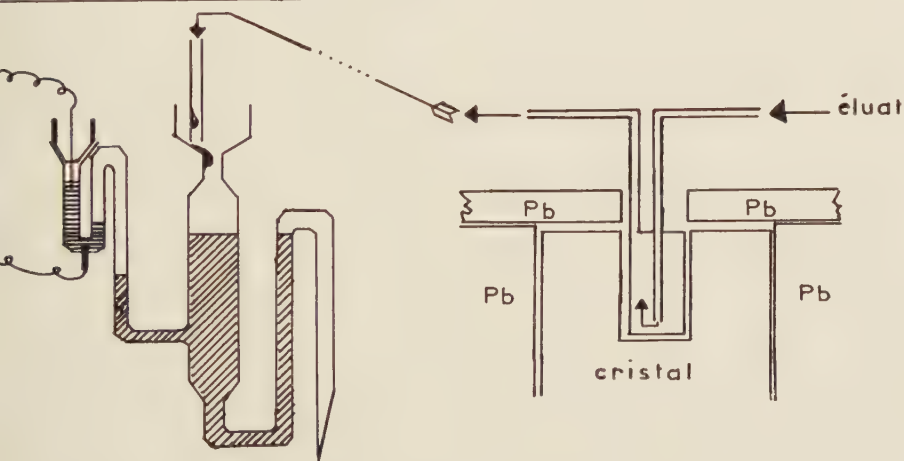
Les rendements des différentes transformations intermédiaires sont variables d'une sonde à l'autre. La détection qualitative et quantitative peut se trouver modifiée. Nous nous sommes donc contraint à comparer les différentes méthodes, en utilisant un même appareillage électronique.

2) *Le spectromètre γ .*

Il nous a permis d'augmenter le rapport signal/bruit de fond en nous centrant sur le pic d'absorption totale de l'iode 131 (364 keV).



PRÉPARATEUR DE RÉACTIONS . SONDE SPECTRO INTEGRATEUR ENREGISTREUR



DETAIL A

DETAIL B

3) *L'intégrateur et l'enregistreur.*

Ces deux appareils nous ont permis le recueil continu du nombre des impulsions transmises par le photomultiplicateur. Un enregistreur de type classique peut être utilisé. Sa sensibilité doit cependant être importante, la différence d'intensité entre les pics étant considérable.

Cet appareillage est intéressant pour un travail de routine, mais nous avons toujours utilisé parallèlement un séparateur de fractions, le contrôle des composés étant évidemment nécessaire.

CHAPITRE II

HYDROLYSAT DE GLANDE THYROÏDE DE RAT

A) OBTENTION DE LA THYROGLOBULINE MARQUEE

Des rats mâles, d'environ 200 g, reçoivent une injection intrapéritonale de 100 μ Curie de Na 131 I (228, 249, 256). Les animaux sont sacrifiés 24 heures après l'injection d'iodure de sodium radioactif.

B) PREPARATION DE L'HYDROLYSAT

Les thyroïdes sont disséquées et pesées. Elles sont finement broyées dans un tube de verre épais, puis rebroyées en présence d'un ml de solution de NaCl à 9 g/litre. Cette solution isotonique est ensuite complétée à 10 ml et une quantité de trypsine Armour (Chicago), d'un poids identique à celui des thyroïdes, exprimé en mg, est ajoutée. Le pH est ajusté à 8,4 avec une solution de NaOH (0,10N); le tube est recouvert de toluène et placé dans une étuve à 38° pendant 72 heures; le pH est rajusté au cours de l'hydrolyse par adjonction de NaOH (0,10N).

C) DISCUSSION

Nous avons choisi une méthode d'hydrolyse enzymatique, à l'exclusion d'hydrolyse acide ou alcaline (baritique ou sodique) dont les inconvénients sont connus.

Nous avons employé un même type d'hydrolyse pour toutes les méthodes étudiées.

En effet, une standardisation aussi poussée que possible de la technique de préparation des échantillons analysés est nécessaire pour avoir des résultats comparatifs.

Il est bien évident que n'employant pas forcément les méthodes d'hydrolyse des auteurs, nous serons amenés à tenir compte de ce facteur lors de la discussion des résultats.

Nous nous sommes donc efforcés au cours de notre expérimentation de rendre à l'hydrolyse l'importance qu'elle peut avoir.

CHAPITRE III

EXPÉRIMENTATION PORTANT SUR QUATRE TECHNIQUES REPRÉSENTATIVES DE CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE

A) SEPARATION DES COMPOSES IODES MINÉRAUX ET ORGANIQUES DE LA GLANDE THYROÏDE SUR RÉSINES ÉCHANGEUSES D'ANIONS DOWEX 1X2

Cette technique a été décrite par Meyniel, Blanquet, Berger, Croizet, Gaillard (174). Compte tenu de sa facilité de mise en œuvre cette méthode est utilisée en routine et nous l'avons particulièrement choisie comme méthode de référence.

MÉTHODE

1°) *Préparation de la résine.*

La résine anionique Dowex, qualité Bio Rad AG 1X2 (200-400 mesh) est livrée sous forme Cl^- . Par rapport à l'ion Cl^- l'ordre de sélectivité des anions pour cette résine se répartit comme suit :

$(\text{Salicylate}) \text{ I}^- \text{ NO}_3^- \text{ Br}^- \text{ Cl}^- \text{ CH}_3\text{COO}^- \text{ OH}^- \text{ F}^-$

la résine est préparée sous la forme OH^- .

Pour cela, on la maintient en contact pendant environ 1/4 d'heure soit avec une solution d'ammoniaque 2N, soit avec une solution d'hydroxyde de sodium 2N. On lave alors à l'eau distillée jusqu'à ce que le pH de l'effluent soit égal à 8,6. On prépare des colonnes de résines de 15 cm de hauteur pour un diamètre de 1,5 cm.

2°) *Hydrolysats.*

On place au sommet de la colonne, en fonction de l'activité radioactive, de 2 à 5 ml d'un hydrolysats trypsique de glandes thyroïdes de

COURBE D'ELUTION : METHODE DE
REFERENCE .

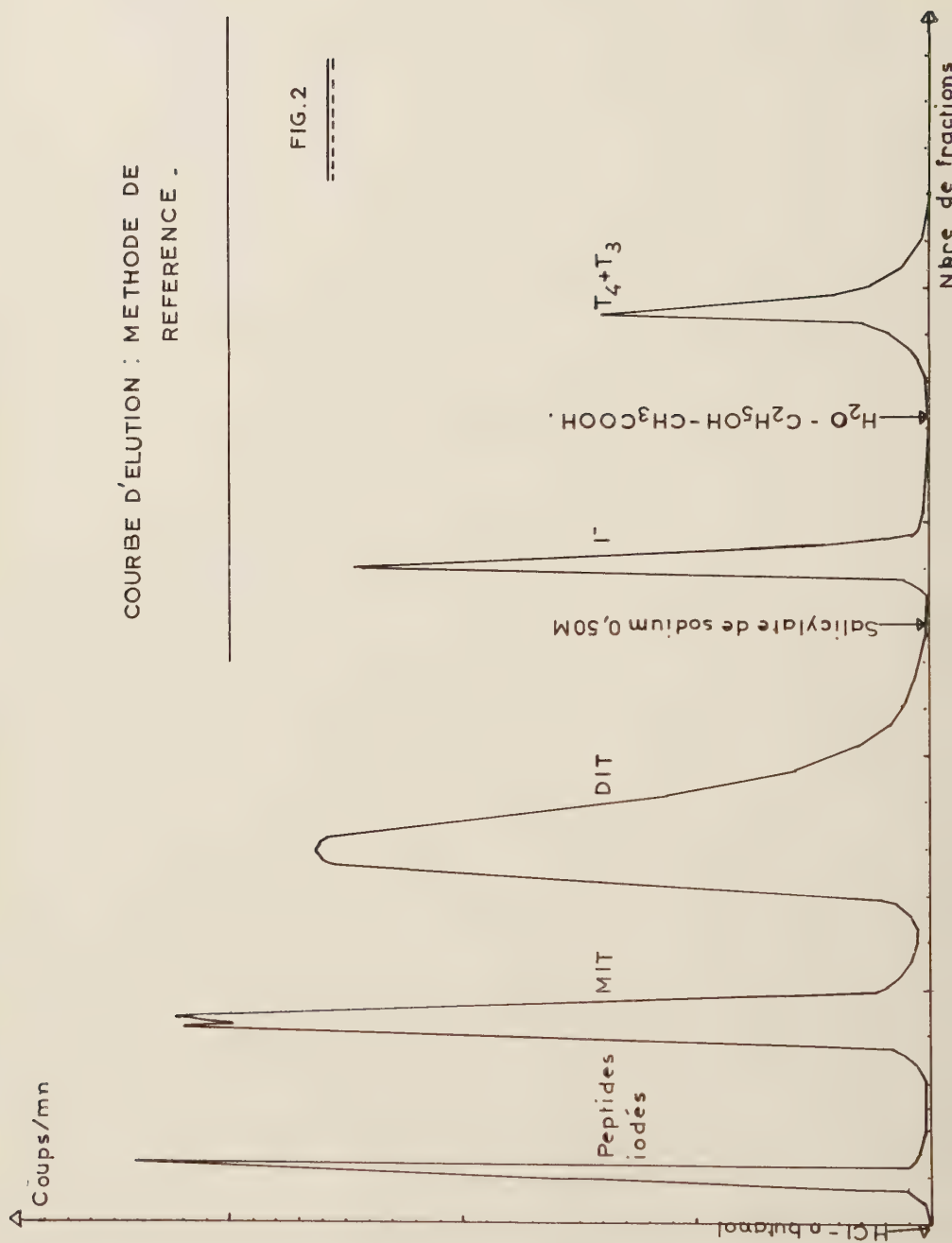


FIG. 2

rat ayant reçu une injection de Na ^{131}I (25 μCurie), 24 heures avant le sacrifice.

3°) *Elution.*

La désorption des composés iodés est réalisée au moyen de trois éluants successifs :

a) une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (0,20N) à laquelle on ajoute 37,5 ml de n-butanol par litre. Elle permet l'obtention de trois fractions distinctes ;

b) une solution aqueuse de salicylate de sodium 0,50M, utilisée à la suite de la précédente. Elle fournit une quatrième fraction iodée ;

c) enfin, une solution eau-éthanol absolu-acide acétique cristallisable (1 : 1 : 3). Elle permet l'élution de la dernière fraction iodée.

La figure n° 2 résume l'ensemble des résultats des éluations successives des différents composés iodés d'un hydrolysate thyroïdien.

RÉSULTATS

L'hydrolysate placé sur la colonne de résine anionique Dowex 1X2 et élué successivement par les trois solvants, conduit à la désorption progressive de ses constituants en quatre fractions correspondant aux pics :

- n° 1 peptides iodés.
- n° 2 M.I.T.
- n° 3 D.I.T.
- n° 4 I .
- n° 5 T_3 - T_4 .

Toutes les moyennes ont été établies sur 39 colonnes. Le rendement moyen de l'élution est de 98 % les valeurs moyennes des différents composants iodés sont en pourcentage :

— peptides iodés		4,5 %
— iodures		13,6 %
— M.I.T.		27,7 %
— D.I.T.		46,0 %
— T_3 , T_4		8,2 %

En vue d'un contrôle de la pureté des différents pics obtenus par l'élution des hydrolysats thyroïdiens de rats, nous les avons soumis à la chromatographie sur papier. Après concentration sous vide, à 37°, les fractions sont reprises par quelques gouttes d'ammoniaque 2N et une chromatographie descendante sur papier Whatman n° 2 en n-butanol-acide acétique-eau (80-20-100) est réalisée.

L'auto-radiochromatogramme présenté à la figure n° 3 rend compte de cette analyse.

Le pic n° 1 composé de plusieurs fractions iodées correspond aux peptides iodés.

Fig. n° 3



(Photo G. Ragonnaud)

AUTORADIOCHROMATOGRAMME
METHODE DE REFERENCE

- 1 — Hydrolysats témoin.
- 2 — Pic n° 1 = peptides iodés.
- 3 — Pic n° 2 = M.I.T.
- 4 — Pic n° 3 = D.I.T.
- 5 — Pic n° 4 = iodures.
- 6 — Pic n° 5 = iodothyronines.
- 7 — Iodure de sodium (Iode 131) témoin.

Le pic n° 2 de Rf (0,50-0,55) correspond à la M.I.T.
Le pic n° 3 de Rf (0,62-0,67) correspond à la D.I.T.
Le pic n° 4 de Rf (0,20-0,22) correspond aux iodures.
Le pic n° 5 de Rf (0,80-0,85) correspond aux iodothyronines.

DISCUSSION

Nous avons toujours eu une excellente séparation des composés classiques : I⁻, MIT, DIT, T₃, T₄ et les contrôles par chromatographie papier se sont révélés toujours excellents.

Outre la qualité des séparations et la facilité de mise en œuvre, l'intérêt de cette méthode réside aussi dans l'isolement du pic n° 1 qui ne correspond pas à des substances classiques. A partir de ce pic, qui ne contient pas d'iodures étant donné leur fixation élective sur la résine, la chromatographie sur papier permet d'objectiver quatre constituants iodés, nettement séparés, et parfois un cinquième.

L'importance relative de ces composés varie en fonction du temps après l'injection de l'iode à l'animal. Pendant les six premières heures, ils sont plus nettement caractérisables.

Le composé iodé le plus important quantitativement, possède un Rf de 0,18 donc très voisin de celui des iodures.

Les substances iodées contenues dans ce premier pic d'élution des résines Dowex IX2 sont représentées, essentiellement par des iodo-peptides identiques à ceux, dont la présence dans la thyroïde, a été démontrée par Lissitzky, Gregoire, Gregoire et Limozin (159), par Lissitzky, Haney (160).

CONCLUSIONS

Cette méthode réalise une séparation très efficace de tous les composés iodés thyroïdiens classiques et des iodopeptides dont l'intérêt biologique semble important.

De plus, cette méthode est rapide, 4 à 6 heures, facile à mettre en œuvre, et elle est surtout fidèle et reproductible.

B) TECHNIQUE DE SEPARATION DES COMPOSES IODES DE LA THYROÏDE PAR FILTRATION SUR GEL DE DEXTRANE

Cette technique a été publiée en 1962, par Lissitzky, Bismuth et Rolland (157). Les auteurs proposent, dans un hydrolysate de thyroïde de rats, une séparation en cinq composés ou groupes de composés iodés, soit : peptides iodés, iodures, M.I.T., D.I.T., iodothyronines.

MÉTHODE

1°) *Hydrolyse des glandes thyroïdes de rats.*

Les auteurs utilisent deux rats mâles (Wistar) de deux cents grammes, et ils les sacrifient 48 heures après une injection intrapéritonéale de 60 µC de Na ¹³¹I sans entraîneur.

Les thyroïdes sont prélevées, congelées, broyées avec de la poudre de verre et digérées pendant 24 h par la pancréatine (Viobin), dans un tampon Tris (hydroxyméthyl) aminométhane-HCl de pH = 8,6 (volume total : 1,5 ml) en présence de thiouracile, selon la méthode de Tong et Chaikoff.

Nous n'avons pas utilisé cette méthode d'hydrolyse, pour les raisons de standardisation que nous avons précédemment développées. Cependant, la méthode par la trypsine, servant à nos expérimentations, ne présente pas théoriquement de possibilités de scission des protéines à un niveau autre que celui où elle se pratique avec la pancréatine. Ceci se retrouve d'ailleurs très bien vérifié expérimentalement, les pourcentages des différents acides aminés ou peptides iodés séparés, étant très voisins.

2°) Méthode de séparation sur colonne de Séphadex.

Nous avons réalisé scrupuleusement les conditions dictées par Lissitzky et ses collaborateurs.

Le gel de dextrane (Séphadex G25) provenait de Pharmacia (Upsala, Suède). Il a été utilisé selon Porath (204). Le gel doit être constitué de particules dont la dimension est de l'ordre de 100 mesh. Il est mis à gonfler dans une solution de chlorure de sodium à 1 % pendant 1 à 2 heures. On supprime les particules de trop petites dimensions par élimination de la suspension surnageant après sédimentation. Le gel est filtré sur Buchner, lavé à l'eau distillée et séché à l'air.

Dans une seconde opération, le gel est mis à gonfler dans un tampon tris (hydroxyméthyl) amino-méthane, 0,05M-HCl de pH = 7,4 et versé dans une colonne de verre d'une section de 2 cm² et sur une hauteur de 48 cm après tassage par pression d'azote et passage de 50 ml environ de solution tampon. Un disque de papier filtre est déposé à la partie inférieure de la colonne. L'hydrolysate préalablement compté au cristal puits, est alors déposé sur la colonne et l'élution est entreprise par 200 ml de tampon tris-HCl 0,05M à pH = 7,4. L'écoulement est réglé par pression d'azote, à la vitesse constante de 1 ml par mn.

Le second éluant, tert.-amylol saturé de NH₄OH 2N, n'est lancé qu'après régénération du gel par lavage prolongé à l'eau. Le contrôle des produits élués est réalisé par chromatographie sur papier, dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment et concernant les contrôles réalisés après chromatographie sur résines anioniques.

RÉSULTATS

La figure n° 4 permet une comparaison de la courbe de séparation publiée par Lissitzky avec une de celles obtenues au cours de notre expérimentation. Le premier pic correspond aux peptides iodés, les pics suivants aux iodures, M.I.T.-D.I.T., les iodothyronines sont retenues par la colonne. Elles sont éluées par l'amylol ammoniacal.

Nous présentons dans le tableau n° 3 les moyennes de nos résultats, portant sur seize colonnes, en comparaison avec les pourcentages obtenus par Lissitzky.

T A B L E A U N° 3

	RESULTATS PUBLIES PAR LISSITZKY		RESULTATS EXPERIMENTAUX	
	CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER	CHROMATOGRAPHIE SUR SEPHADEX G-25	CHROMATOGRAPHIE DE REFERENCE	CHROMATOGRAPHIE SUR SEPHADEX G-25
PEPTIDES IODES	3,6	2,0	3,0	2,0
IODURES	5,5	12,4	14,3	17,4
M. I. T.	29,5	28,0	27,1	26,3
D. I. T.	44,8	42,9	46,6	50,0
$T_4 + T_3$	16,6	14,7	9,0	4,0

A chaque colonne sur Sephadex, nous avons fait correspondre une colonne sur 1X2 prise comme méthode de comparaison, les deux ayant été réalisées avec un même hydrolysate de thyroïde de rat.

DISCUSSION

Comme on peut le constater, les pourcentages sont assez voisins. Nous allons analyser point par point les résultats obtenus.

1°) M.I.T. - D.I.T.

La méthode sur Sephadex nous a toujours donné une pureté satisfaisante pour le groupe des iodotyrosines. Séparément, ils ne nous a pas été possible d'obtenir de la D.I.T. sans M.I.T. et, à un moindre degré, de M.I.T. sans D.I.T. Nous nous sommes pourtant entouré d'un maximum de précautions : vitesse d'écoulement très constante, longueur de la colonne à 48 cm, chromatographie de contrôle réalisée avec seulement 6 ml au sommet des pics. Pour avoir une meilleure séparation, nous avons essayé quelques colonnes en augmentant la hauteur de gel (60 cm), en ralentissant l'élution (0,7 ml/mn). Les résultats n'ont pas été améliorés. Ce chevauchement est logique. Nos courbes d'activité expérimentales, comme celles publiées par les auteurs témoignent d'une résolution insuffisante de la M.I.T. et de la D.I.T. Le point minima d'activité entre les deux pics est de l'ordre de 50 % de l'activité maximale observée.

2°) Iodures.

Nous trouvons des pourcentages d'iodures sensiblement supérieurs à ceux donnés par Lissitzky et ses collaborateurs. Nos résultats sont confirmés par des mesures quantitatives de chromatographie sur papier.

Ce taux plus élevé d'iodures est dû au délai de 24 h au lieu de 48 h au bout duquel nous avons sacrifié les rats. Inversement, nous avons trouvé un taux d'iodothyronines inférieur.

3°) *Peptides iodés.*

Nous avons constaté sur les autoradiographies de contrôle, la présence de petits résidus de peptides iodés migrant au voisinage des iodures.

Quarante pour cent environ des peptides iodés passent avec les iodures par cette technique.

Sur Sephadex, les peptides iodés élués par le tampon tris HCl 0,05M migrent en tête de colonne.

Cette constatation nous amène à faire une hypothèse sur leurs caractéristiques. En effet, Porath (204), travaillant sur la filtration des peptides et des acides aminés par le gel de dextrane, constate que « les peptides basiques se déplacent plus vite au travers des gels de dextrane dans les solvants acides tel que l'acide acétique 1M ».

L'éluion des peptides iodés plus rapide que celle des acides aminés par le tampon tris HCl à caractère très légèrement acide, serait donc en faveur d'un caractère basique de ces peptides.

4°) *Iodothyronines.*

Leur éluion qualitative est très satisfaisante. Cependant, tous nos efforts pour une éluion totale sont restés vains.

Remarque : Pour la raison exposée au paragraphe « iodures », il est naturel d'avoir un pourcentage en iodothyronines inférieur à celui donné par les auteurs.

Les iodothyronines sont très solidement liées au gel et malgré une régénération « par lavage prolongé à l'eau dans un vase en verre », nous n'avons jamais pu obtenir de pourcentages comparables à ceux obtenus par les autres méthodes.

Les résultats comparatifs entre la méthode au Sephadex et la chromatographie papier par n-butanol/acide acétique/eau donnés par l'auteur, vont d'ailleurs dans ce sens quoique à un degré plus faible.

CONCLUSIONS

La méthode sur Sephadex G 25 de Lissitzky, Bismuth et Rolland est relativement simple à mettre en œuvre. Elle donne une bonne séparation des iodures, du bloc des iodotyrosines et des iodothyronines. D'autre part, elle permet une amorce d'hypothèse sur la constitution des peptides iodés.

Cependant, on peut lui reprocher la difficulté d'éluion des iodothyronines par l'amyloï ammoniacal et une séparation insuffisante des peptides iodés, de la M.I.T. et de la D.I.T.

Enfin, la lenteur de l'éluion, en comparaison de celle nécessaire à la méthode témoin, est un handicap.

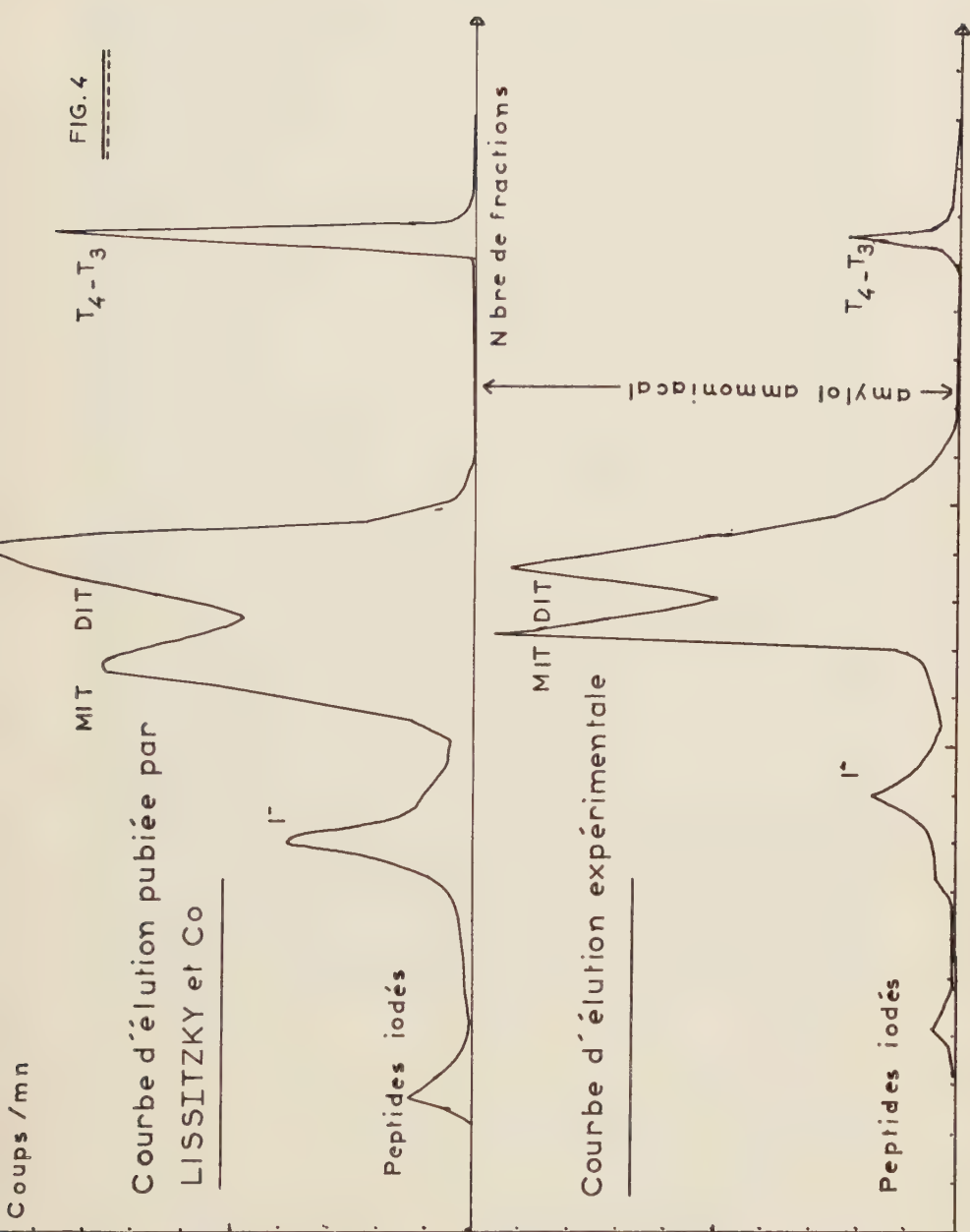


Fig. 5



AUTORADIOCHROMATOGRAMME

METHODE SUR SEPHADEX

- 1 — Pic n° 1 = iodures.
- 2 — Pic n° 2 = M.I.T.
- 3 — Pic n° 3 = D.I.T.
- 4 — Pic n° 4 = iodothyronines.
- 5 — Hydrolysats témoin.
- 6 — Iodure de sodium (Iode 131) témoin.

C) ANALYSE DES ACIDES AMINES IODES ET DES IODURES DANS UN HYDROLYSAT DE PROTEINES IODEES SUR DOWEX 50WX4

Cette technique publiée en 1961 par Block et Mandl (33) propose « une détermination quantitative des iodures, M.I.T., D.I.T., T₄, T₃ et 3,5' diiodothyronines (T₂) dans des hydrolysats enzymatiques, de moins de 1 mg d'iodoprotéines, par une méthode entièrement automatique. Les composés iodés non identifiés dans les hydrolysats sont également révélés ».

MÉTHODE

1°) *Fractionnement des protéines de la thyroïde.*

Les glandes thyroïdes fraîchement prélevées, sont rincées avec NaCl à 0,9 % (poids/volume), congelées, coupées en morceaux et épuisées trois jours à 4°C par NaCl 0,9 % en présence de toluène. La solution est filtrée, le résidu est broyé au mixer avec de nouveau une solution de NaCl à 0,9 % à 4°C. Cette seconde solution est filtrée à son tour et réunie avec la première.

Les protéines thyroïdiennes solubles sont alors fractionnées selon la méthode de Stanley (267). Le pH et la température sont maintenus respectivement à 7,0-7,2 et 4°C.

a) Le précipité mis en suspension dans (NH₄)₂ SO₄ à 45 % est ramené à 37 % par l'eau. La partie insoluble est éliminée.

b) Le filtrat est alors ramené à 41 % de (NH₄)₂ SO₄, le précipité P41 correspondant selon Stanley à la thyroglobuline. Cette fraction sert à la séparation de l'hydrolysat protéinique séparé par les auteurs sur colonne de résine Dowex 50X4.

2°) *Hydrolyse des iodoprotéines.*

Un échantillon d'environ 10 mg est mis en suspension dans 2,5 ml d'un tampon carbonate d'ammonium 0,01M avec 10 % V/V d'éthanol, à pH = 8,4. On ajoute 0,1 mg d'enzyme P, extrait de *Streptomyces griseus* (Biddle-Sawyer C° N.Y.), dans 0,5 ml du même tampon. On laisse l'hydrolyse se réaliser pendant 48 heures à 40°C. Un millilitre d'éthanol est ajouté et le volume de la solution est amené à 10 ml avec un tampon formiate d'ammonium 0,2N, pH = 3,9 contenant 30 % V/V d'éthanol.

L'hydrolysat peut être conservé à 4°C.

Les auteurs n'emploient pas de thiouracile. Nous sommes là encore en présence d'une réaction enzymatique voisine de l'hydrolyse par la trypsine, mais plus complète. En effet, les peptides sont également hydrolysés.

3°) *Méthode de séparation sur colonne de Dowex 50WX4.*

La résine Dowex 50WX4 est purifiée par traitement répété avec 2 litres d'acide chlorhydrique 4 fois normal (5) et 500 ml d'eau et fractionnée par la méthode hydraulique d'Hamilton (101). Cette méthode

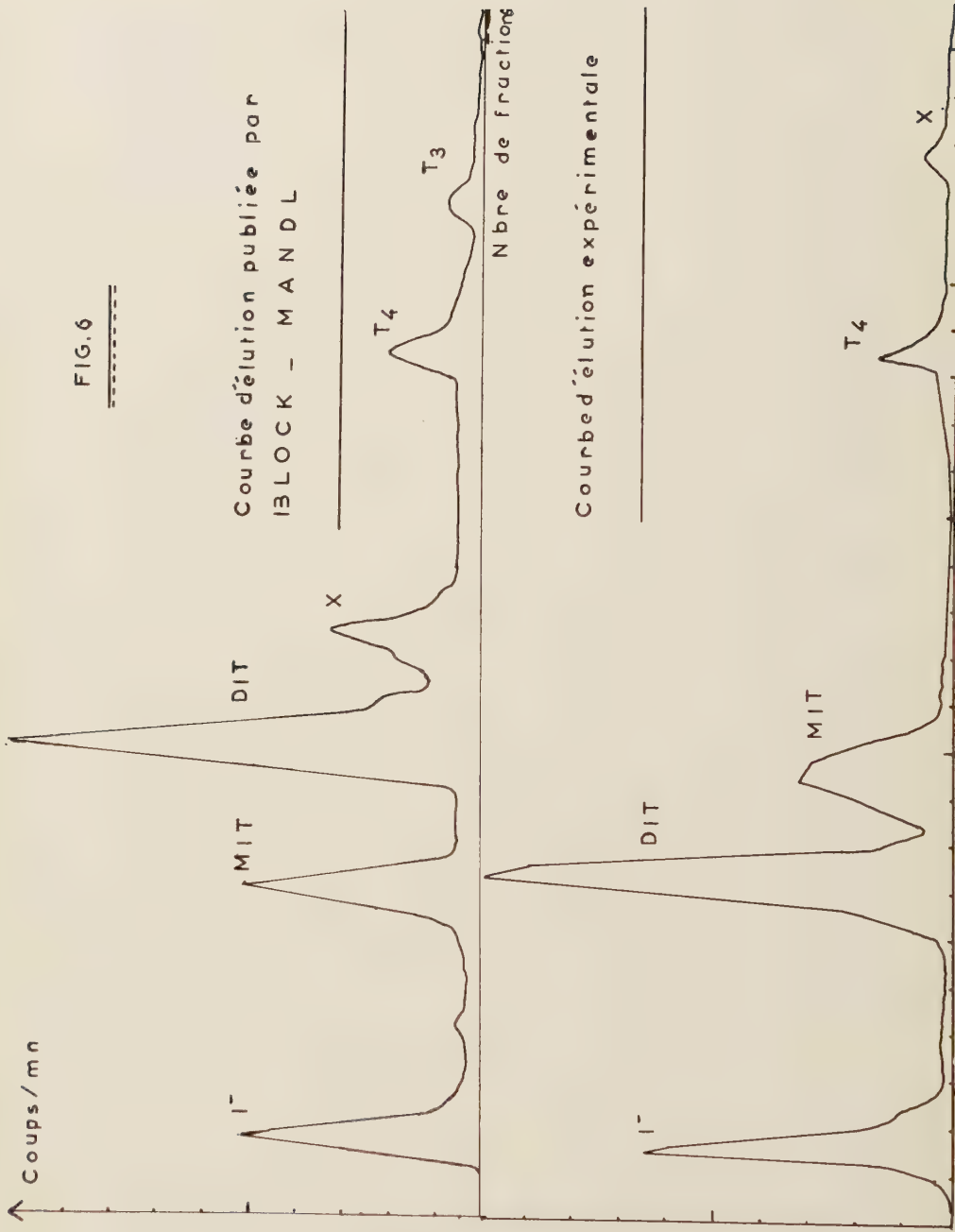


FIG. 6

Fig. 7



(Photo G. Ragonnaud)

1 2 3 4 5 6

AUTORADIOCHROMATOGRAMME

METHODE DE BLOCK & C°.

- 1 — Pic n° 1 = iodures.
- 2 — Pic n° 2 = D.I.T.
- 3 — Pic n° 3 = M.I.T.
- 4 — Pic n° 4 = iodothyronines.
- 5 — Hydrolysats témoin.
- 6 — Iodure de sodium (Iode 131) témoin.

recherche un fractionnement en fonction de la taille des particules de résine. Pour cela, on utilise une technique d'écoulement à vitesse variable, et le contrôle de la taille des particules s'effectue par photographie d'une goutte de résine en suspension dans l'eau, déposée entre lame et lamelle. La fraction contenant des grains de 20 à 30 microns est utilisée pour la préparation d'une colonne à chromatographie d'une section de 0,9 cm et d'une longueur de 20,0 cm. La colonne est tassée sous pression. La résine est convertie dans sa forme NH_4^+ par de l'ammoniaque normal, puis tamponnée par traitement avec du formiate d'ammonium 0,2M avec 30 % V/V d'éthanol, à pH = 3,9 (152). Un volume de 0,5 à 3,0 ml d'hydrolysats d'iodoprotéines marquées à l'iode 131 (représentant de 200 à 1 000 μg de protéines) est introduit à la partie supérieure de la colonne. Immédiatement après, l'échantillon est drainé à travers la résine sous pression d'azote, 0,5 ml de tampon formiate sont ajoutés. L'espace au-dessus de la résine est alors soigneusement rempli avec le tampon. La séparation des acides aminés iodés est alors entreprise par gradient d'élution.

Le schéma d'élution est le suivant :

- 30 ml de A.
- 25 ml de A + 5 de B.
- 20 ml de A + 10 de B.
- 15 ml de A + 15 de B.
- 10 ml de A + 20 de B.
- 30 ml de B.
- 60 ml de C.
- Solution A = tampon formiate d'ammonium 0,2M, pH = 3,9 30 % V/V d'éthanol.
- Solution B = NH_4OH 0,2N avec 30 pour cent V/V d'éthanol.
- Solution C = NH_4OH 0,5N avec 30 pour cent V/V d'éthanol.

La vitesse d'écoulement est réglée et maintenue à 0,6 ml/mn.

4°) Analyse de l'éluat.

1°) Les auteurs se basent sur l'effet de catalyse de l'iode au cours de la réduction du sulfate sérique par l'arsénite (251).

La réaction est effectuée à 40°C, pendant environ 10 minutes. La sensibilité est optima dans ces conditions. Le dosage est colorimétrique. La décoloration est mesurée par un colorimètre, muni d'un filtre à 420 m μ et enregistrée sur papier.

Les auteurs présentent la réaction comme quantitative. Ils admettent cependant que l'effet catalytique de l'iode sur la réduction des ions sériques par l'acide arsénieux est différent pour chacun des composés étudiés. Les résultats sont intégrés à partir de la courbe par planimétrie et comparés à des courbes témoins. Les auteurs estiment à ± 3 % l'erreur commise.

2°) Quant à nous, nous avons procédé à une séparation sur colonne de 50WX4, techniquement identique à celle des auteurs considérés. Nous avons très classiquement utilisé un hydrolysats tryptique de

thyroïde de rats ayant reçu une dose de Na ^{131}I . Nous avons mesuré l'activité γ des fractions de 2 ml séparées et nous avons contrôlé cette séparation par chromatographie sur papier.

RÉSULTATS

La figure n° 6 permet une comparaison de la courbe d'élution publiée par Block et Mandl, avec une de celles obtenues au cours de notre expérimentation.

Les auteurs, travaillant en ^{127}I , éluent successivement : les iodures, la M.I.T., la D.I.T., un pic de composés inconnus qu'ils pensent être des peptides, la tétraiodothyronine et la triiodothyronine.

Nous-mêmes, avons réalisé trente chromatographies comparatives sur colonne. Nous avons utilisé un hydrolysate de thyroïde de rats ayant reçu une dose de Na ^{131}I en intrapéritonale. Les chromatographies sur colonne de dowex 50WX4 ont été réalisées en suivant scrupuleusement les données expérimentales publiées par Block et Mandl. Nous avons caractérisé successivement des pics correspondant aux iodures à la D.I.T., à la M.I.T., aux iodothyronines.

La photographie (fig. 7) représente un des autoradiogrammes sur papier. Ils nous ont permis le contrôle et la caractérisation des différents composés figurant dans les pics. Chaque sommet de pic a été ainsi contrôlé.

Enfin, dans le tableau n° 4 on peut comparer les résultats expérimentaux, exprimés en pourcentage d'iode 131 . Les moyennes fournies portent sur trente colonnes.

— La colonne (a) donne les résultats de la séparation sur Dowex 1X2 selon la technique Blanquet-Meyniel.

— La colonne (b) donne les résultats de la séparation sur Dowex 50WX4, selon la technique de Block et Mandl, sans poursuivre l'élution au-delà des iodothyronines.

— La colonne (c) donne les résultats obtenus en poussant l'élution au-delà des iodothyronines, c'est-à-dire, comme nous le verrons en éluant, semble-t-il les peptides iodés.

T A B L E A U N° 4

	BLANQUET, MEYNIEL	BLOCK, MANDL	
	(a)	(b)	(c)
PEPTIDES IODES	4,6		4,6
IODURES	15,7	16,2	16,0
M. I. T.	26,3	27,0	23,7
D. I. T.	45,7	49,9	49,6
$\Gamma_3 + \Gamma_4$	7,7	6,9	6,1

DISCUSSION

Les résultats quantitatifs, si l'on s'en tient au pourcentage, sont très satisfaisants, et les résultats des deux méthodes se recoupent. Cependant, quelques points méritent une discussion.

1°) Iodures.

Les iodures constituent un pic bien séparé, entre le 10^e et le 30^e ml, en tête de l'élution. Il faut attendre environ 60 ml pour avoir l'amorce du pic suivant.

Le pourcentage d'iodure est identique expérimentalement à celui trouvé par la méthode de Blanquet-Meyniel à partir d'hydrolysats identiques.

2°) M.I.T. - D.I.T.

Les iodotyrosines nous ont posé un problème difficile. En effet, nous avons une inversion de l'ordre d'élution annoncé par les auteurs. Le second pic correspond à la D.I.T., le troisième à la M.I.T. Nous avons changé deux fois de lot de résine 50WX4, pour éliminer le risque d'une résine ne possédant pas toutes les propriétés désirables. Nous avons changé et vérifié plusieurs fois les éluants.

Le pH du tampon formiate d'ammonium et des solutions d'ammoniaque 0,2N et 0,5N ont été vérifiés. Nous avons essayé à différentes températures, maintenues constantes à chaque expérience.

Comme on peut le constater sur la chromatographie de contrôle, sur papier, la D.I.T. n'est pas absolument pure. On relève, sur toutes les autoradiographies de contrôle, la présence de M.I.T. et d'iodures en quantité faible mais non négligeable. Par contre, la M.I.T. éluee en troisième position est toujours absolument pure.

Nous sommes amenés à conclure que dans l'ordre d'élution, nous trouvons, par la méthode de Block et Mandl, les iodures, la D.I.T., la M.I.T. et non comme l'affirme la publication initiale, les iodures, la M.I.T., la D.I.T.

Du point de vue quantitatif, nous constatons que le pourcentage de D.I.T. est de 10 % supérieur à celui obtenu par la méthode Blanquet-Meyniel. Ceci recoupe parfaitement, comme nous l'avions remarqué, la présence de petites quantités de M.I.T. et d'iodures élués en même temps que la D.I.T.

Quant au pourcentage de M.I.T., il est bien sûr légèrement inférieur à celui obtenu avec notre méthode de référence, une partie, faible il est vrai, ayant été éluee avec la D.I.T.

3°) Iodothyronines.

Les auteurs publient la présence de deux pics différents pour la thyroxine et la triiodothyronine. Nous avons effectivement, dans les meilleurs cas et, à condition d'avoir un écoulement de l'ordre de 0,4 à 0,5 ml/mn, obtenu les deux pics distincts.

Nous avons été amenés à modifier pour trois colonnes certaines

conditions expérimentales pour obtenir une séparation meilleure de T_3 et T_4 . Nous avons procédé à une augmentation de la longueur de la colonne ($L = 25$ cm) et à un ralentissement de la vitesse d'écoulement (0,4 ml/mn). Nous avons alors dans ces conditions, eu effectivement deux pics. La photographie de l'hydrolysât correspond à l'autoradiographie sur papier des pics séparés et de l'hydrolysât utilisé, pour une des trois expériences (les résultats des deux autres expériences sont identiques). La première tache correspond à de la thyroxine, la présence d'iode serait due à notre avis, à une dégradation partielle de la T_4 au cours de l'évaporation à 37° des 10 ml d'éluat nécessaire à l'obtention de la prise d'essai de contrôle.

La seconde tache, semble bien être, comme le prévoient les auteurs, de la triiodothyronine. Cependant, il convient d'observer la présence d'une tache dont le R_f est voisin des peptides iodés. Nous y reviendrons.

Cette méthode présente l'avantage appréciable de séparer les deux principales iodothyronines. Cependant, nous n'avons obtenu ce résultat que dans la mesure où nous avons modifié, dans le sens énoncé ci-dessus, les conditions d'élution préconisées par les auteurs ; et ceci au détriment de la rapidité de la méthode.

4°) *Peptides iodés.*

Les auteurs, sous le terme de pics non identifiés, immédiatement élués après la D.I.T., estiment qu'ils doivent être en présence de peptides iodés. « Cette inconnue n'apparaît ni après la digestion par l'enzyme P du streptomyces griseus, ni après l'hydrolyse par la Viobase, donc indiquant que ce peut être un peptide ».

Cette conclusion nous paraît logique.

— Cependant, nous n'avons, au cours de nos séparations, jamais trouvé, ni en importance, ni en place, un pic correspondant.

— Les rendements sont en moyenne de 94 %. Six pour cent restent sur la colonne, il est très probable que ce sont de grosses molécules, c'est-à-dire les peptides iodés et un résidu de T_3 et T_4 . Le pic supplémentaire obtenu est, malheureusement, constitué par un mélange d'iodothyronines (T_3 surtout) et de peptides iodés. La photographie montre la proportion de T_3 et deux taches correspondent au R_f de peptides iodés.

CONCLUSIONS

Les auteurs présentent cette méthode comme une technique pratique, automatique et facile à mettre en œuvre.

— Le dosage chimique, par catalyse de l'iode sur la réduction des ions cérîques par l'acide arsénieux, est de l'avis même des auteurs, différent selon les composés étudiés. Ce dosage nécessite donc des courbes standard.

— Il est nécessaire, chez l'homme, de faire un prélèvement par

biopsie de tissus thyroïdiens ; ce procédé toujours délicat est souvent contre indiqué.

— Trente chromatographies sur colonne, avec contrôle par autoradiochromatogrammes sur papier, ont été consacrés à l'étude de cette méthode. Dans toutes les chromatographies sur 50WX4, selon la technique de Block et Mandl, la monoiodotyrosine pure a été éluée après un mélange composé en majeure partie de diiodotyrosine et d'une très petite quantité de M.I.T. et d'iodures. Nous sommes sur ce point en contradiction formelle avec les auteurs.

— Nous n'avons jamais trouvé de pic suivant immédiatement ceux des iodotyrosines, dit « de nature inconnue » par les auteurs.

— Nous avons constaté la présence de peptides iodés au niveau des éluats comportants les iodothyronines. L'élution de ces iodothyronines et des peptides iodés est incomplète.

— En conclusion, nous ne pensons pas que la méthode d'exploration de la fonction thyroïdienne sur colonne de 50WX4, présentée par Block et Mandl, puisse apporter de meilleurs renseignements que les autres méthodes isotopiques. D'autre part, nous ne sommes pas convaincus de la facilité et surtout de la fidélité de cette méthode.

D) ETUDE DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE PAR LA RESINE DOWEX 50X4, D'ACIDES AMINES MARQUES A L'IODE 131

Cette technique a été publiée en 1960 par Reilly, Searle et Scott (209). C'est une adaptation de la méthode décrite par Lerner (152), utilisant la résine Dowex 50WX4 30-35 μ , pour l'analyse des hydrolysats thyroïdiens.

Les auteurs estiment que cette « méthode offre des avantages de facilité pour le maniement de l'échantillon et simplifie les contrôles des éluats des méthodes existantes, utilisant la résine échangeuse d'anion Dowex 1X2 200-400 mesh ».

Nous avons, malgré tout, expérimenté cette technique.

MÉTHODE

1°) Préparation de la résine.

La Dowex 50X4, 30-35 μ est cyclée par lavage dans la soude normale ; elle est alors lavée jusqu'à élimination des ions hydroxydes ; puis elle est mise en suspension dans un tampon formiate d'ammonium 0,2N à pH = 4,5. La résine en suspension est versée sur une hauteur de 15 cm, dans une colonne thermostatée à 35 °C, d'un diamètre intérieur de 1,3 cm, avec un verre fritté à la partie inférieure.

2°) Colonne.

L'hydrolysate de thyroïde de rats, ayant reçu une dose traceuse d'iode 131 vingt-quatre heures avant le prélèvement des glandes, est

déposé sur la colonne. Les auteurs opèrent sur du sérum qu'ils amènent à un pH de 4,5 par de l'acide formique à 10 % « dans le but de dissocier les acides aminés iodés des protéines auxquelles ils sont liés ». Ils éliminent le précipité formé par centrifugation et utilisent le sérum clair surnageant. Le précipité représenterait moins de 1 % de l'activité totale.

Nous-mêmes avons équilibré l'hydrolysât de glande thyroïde de rats avec le tampon formiate d'ammonium pH = 4,5 servant en première élution. Des fractions de 2 ml ont été recueillies, contre 3 ml chez les auteurs, le rendement de notre cristal puits étant optimum pour 2 ml.

Après avoir laissé filtrer l'hydrolysât on lave par 30 ml de tampon formiate d'ammonium pH = 4,5.

Les éluants sont :

— Un tampon formiate d'ammonium pH = 4,5 avec 30 pour cent d'éthanol, qui élue dans l'ordre :

- les iodures,
- la M.I.T.,
- la D.I.T.

— Un tampon formiate d'ammonium pH = 9,2 avec 30 pour cent d'éthanol qui élue :

— les iodothyronines : tétraiodothyronine et triiodothyronine.

La thyroïde de rat n'ayant pas de T_2 , nous n'avons pas pu suivre l'élution de ce produit.

RÉSULTATS

La figure 8 nous permet une comparaison de la courbe de séparation obtenue à partir d'un mélange de produits standard en quantité déterminée, selon la méthode étudiée, et la courbe d'élution que nous avons obtenue par la même technique à partir d'un hydrolysât de thyroïde de rats ayant reçu de l'iode 131 en intrapéritonale et sacrifiés après 24 heures.

Comme les auteurs, nous éluons dans l'ordre, avec le tampon formiate d'ammonium pH = 4,5 avec 30 % d'éthanol : les iodures, la M.I.T., la D.I.T. et avec le tampon formiate d'ammonium (pH = 9,2) 30 % d'éthanol, les iodothyronines.

Nous constatons une élution moins rapide que celle annoncée par les auteurs.

Nous avons comme pour les autres méthodes, pris pour référence la séparation sur colonne de résine 1X-2 de Blanquet-Meyniel.

Nous présentons dans le tableau n° 5 les moyennes de nos résultats, portant sur seize colonnes.

Chaque méthode expérimentée correspond à une méthode de référence réalisée à partir d'un même hydrolysât de thyroïde de rat.

T A B L E A U N° 5

	CHROMATOGRAPHIE SUR DOWEX 1x2	CHROMATOGRAPHIE SUR DOWEX 50x4
PEPTIDES IODES	5,98	
IODURES	10,81	13,74
M. I. T.	29,57	28,75
D. I. T.	45,64	39,52
T ₄ + T ₃	8,00	17,99

DISCUSSION

1°) Iodures.

Les iodures sont élués avec le front du premier éluant. Ils sont concentrés sur moins de 10 ml. Ils sont purs de tout autre corps.

Le pourcentage d'iodures par la méthode à la résine 50X4 est de 15 % supérieur à celui obtenu avec la résine 1X2.

2°) Iodotyrosines.

La monoiodotyrosine

Elle est éluee pure avec 40 ml d'éluant. La résolution avec la diiodotyrosine est très bonne. En effet, entre les deux pics, l'activité descend à environ 2 % de la radioactivité moyenne maximum observée pour ces deux pics. Les auteurs obtiennent d'ailleurs une résolution identique. C'est de toutes les méthodes étudiées, celle qui nous a permis la meilleure séparation entre M.I.T. et D.I.T.

La diiodotyrosine

Au cours de toute notre expérimentation, nous n'avons jamais isolé par autoradiographie de contrôle sur papier, d'iodures et d'iodothyronines dans le pic de la diiodotyrosine et nous n'avons que très exceptionnellement détecté des traces de M.I.T.

Cependant, lorsque nous comparons les pourcentages de D.I.T. obtenus par les deux méthodes, nous observons un pourcentage considérablement plus faible, de l'ordre de 6 %, par la méthode de Reilly et Searle. Effectivement, à l'éluion des iodothyronines par le tampon formiate d'ammonium pH = 9,2 nous avons toujours une quantité non négligeable de D.I.T. La mesure quantitative des taches obtenues par autoradiographie du pic correspondant théoriquement à des iodothyronines, nous a révélé la présence de 35 % de diiodotyrosine. Nous reviendrons d'ailleurs sur ces pourcentages.

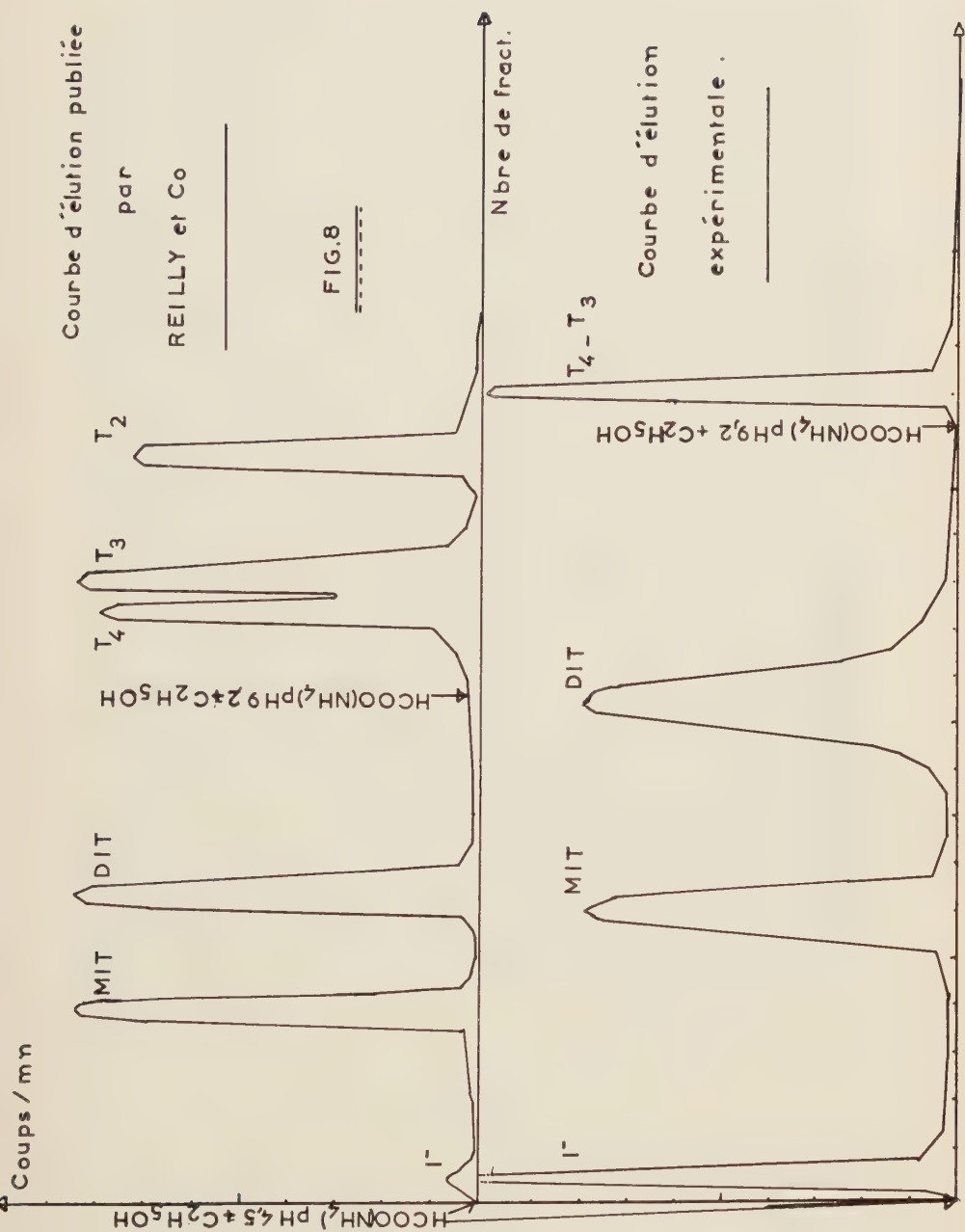


FIG.8

Fig. 9



AUTORADIOCHROMATOGRAMME

METHODE DE REILLY & C°

- 1 — Hydrolysats témoin.
- 2 — Pic n° 1 = iodures.
- 3 — Pic n° 2 = M.I.T.
- 4 — Pic n° 3 = D.I.T.
- 5 — Pic n° 4 = iodothyronines.
- 6 — Iodure de sodium (Iode 131) témoin.

Le pourcentage rectifié de diiodotyrosine serait donc de $39,5 \pm 6 \%$, en accord complet avec celui obtenu par la méthode de référence. En effet, nous avons environ 10 % de D.I.T. qui n'est pas éluee par le premier tampon. La différence entre les résultats obtenus par les résines 1X2 et 50X4 est alors inférieure à 1 %.

3°) Iodothyronines.

Nous avons élué les iodothyronines par le tampon formiate d'ammonium pH = 9,2 30 % d'éthanol, 100 ml après la fin de l'élution du pic de la D.I.T. Avec le front de cet éluant et seulement sur 10 ml, nous obtenons un pic très aigu. Comme tous les autres, le sommet de ce pic est déposé ponctuellement pour effectuer une chromatographie sur papier servant à la détermination et au contrôle du corps obtenu. Au développement par autoradiographie, nous avons déterminé la présence de D.I.T., d'iodothyronines (thyroxine essentiellement) et de peptides iodés. Nous avons calculé les pourcentages de ces corps sur six autoradiographies.

Nous avons obtenu un pourcentage moyen de 50 % d'iodothyronines, 35 % de diiodotyrosine et 15 % de peptides iodés.

Si nous corrigeons en conséquence les pourcentages obtenus, nous avons :

T A B L E A U N° 6

	1 X 2	50 X 4
PEPTIDES IODES	5,98	3,0
IODURES	10,81	14,0
M. I. T.	29,57	28,5
D. I. T.	45,64	45,5
T ₃ + T ₄	8,00	9,0

Les pourcentages obtenus par les deux méthodes se recoupent alors parfaitement.

CONCLUSION

Cette méthode est excellente dans son ensemble. Les séparations, en particulier, celles des iodures, de la M.I.T. et de la D.I.T., sont remarquables. Nous devons constater toutefois *qu'elle ne permet pas d'isoler les peptides iodés,*

— *d'éluer totalement la D.I.T. (environ 10 %),*

— d'autre part, l'élution trop brutale des iodothyronines, provoque un mélange avec les peptides iodés et les restes de D.I.T.

Enfin, la méthode est lente : l'élution seule, comme l'auteur l'indique d'ailleurs, dure de 20 à 22 heures et pose ainsi des problèmes de rendement, d'horaires et interdit, malgré l'automatisation, son utilisation comme méthode de routine.

Ces quelques remarques et l'intérêt certain de cette résine 50X4 pour séparer les acides aminés iodés thyroïdiens, nous ont incité à modifier la méthode pour essayer en particulier d'éluer séparément les peptides iodés.

CHAPITRE IV

MÉTHODE DE REILLY W.A., SEARLES G.L. ET SCOTT K.G. MODIFIÉE

Pourquoi une modification ?

Nous obtenons successivement au fur et à mesure de l'élution alcaline, des molécules de poids moléculaire de plus en plus élevé : I^- , M.I.T., D.I.T., iodothyronines. Nous n'avons pas de peptides iodés. Le rendement est de l'ordre de 90 % en moyenne ; le contrôle de l'activité restant sur la résine confirmant ce chiffre avec un pourcentage d'environ 10 %. Il est tentant de conclure que les peptides iodés restent adsorbés sur la colonne. Nous avons donc essayé de les éluer par 50 ml de soude N. Cette désorption nous a permis de récupérer des composés iodés représentant 2,50 % de l'activité totale.

Ces composés ont, au contrôle autoradiographique, les caractéristiques de migration des peptides iodés (R_f) déjà trouvées dans le mélange présent dans le pic précédent. Ils correspondent aux taches observées à partir du pic n° 1 de la méthode Blanquet-Meyniel.

METHODE

Nous avons conservé comme premier éluant le tampon formiate d'ammonium $pH = 4,5$ avec trente pour cent d'éthanol, celui-ci nous ayant donné d'une façon générale satisfaction.

Par contre, nous avons pour le second éluant, cherché à nous rapprocher le plus possible du pK de la triiodothyronine, espérant une élution plus sélective. Nous avons donc remplacé le tampon formiate d'ammonium $pH = 9,2$ avec trente pour cent d'éthanol par cent ml d'un tampon tris (hydroxy-méthyl) amino méthane à $pH = 8,2$. Nous avons alors terminé l'élution par 40 ml de soude normale.

Courbe d'élection publiée

८८२

REILLY et Co.

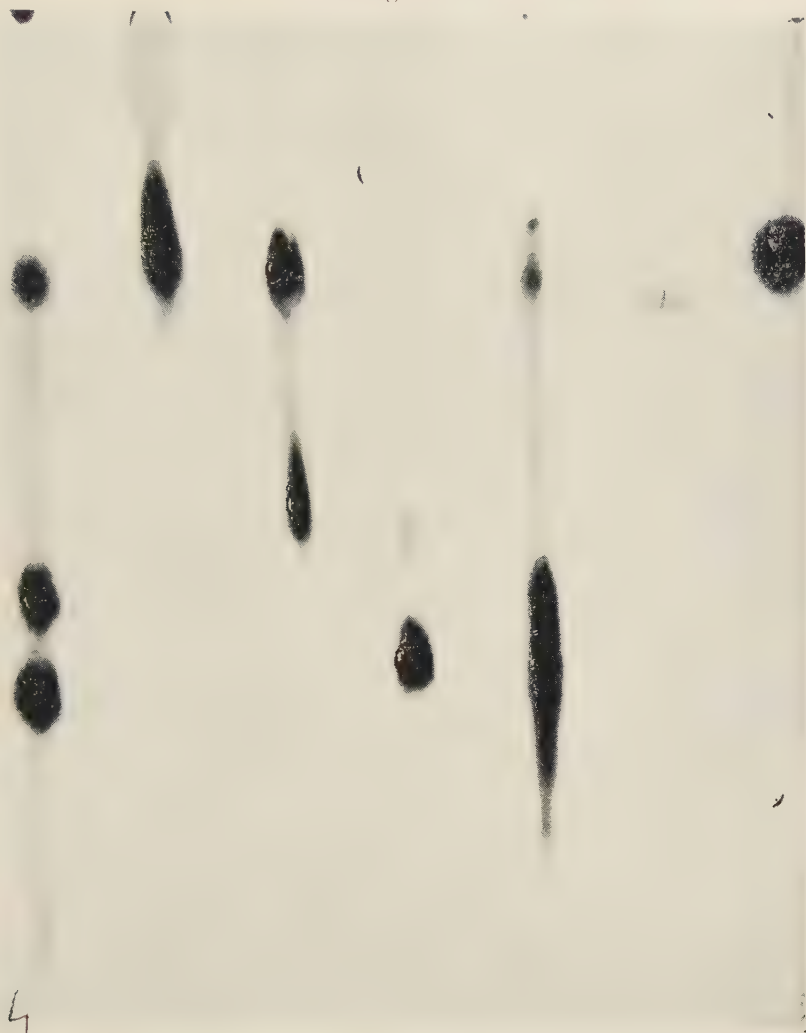
FIG. 10

Nbre de fractions

Courbe d'élu­tion
expérimentale

Peptides iodés

Fig. 11



(Photo G. Ragonnaud)

1 2 3 4 5 6 7

AUTORADIOCHROMATOGRAMME
METHODE PRECEDENTE MODIFIEE

- 1 — Hydrolysats témoin.
- 2 — Pic n° 1 = iodures.
- 3 — Pic n° 2 = M.I.T.
- 4 — Pic n° 3 = D.I.T.
- 5 — Pic n° 4 = iodothyronines.
- 6 — Pic n° 5 = peptides iodés.
- 7 — Iodure de sodium (Iode 131) témoin.

RESULTATS

Les iodures et les iodotyrosines sont élués d'une manière parfaitement identiques, la méthode étant la même jusqu'à ce stade de la séparation.

Par contre, la séparation des iodothyronines éluées par le tampon tris est légèrement meilleure quoique toujours encombrée par quelques peptides iodés.

Le tableau n° 7 donne la moyenne des résultats obtenus :

T A B L E A U N ° 7

	1 X 2 METHODE DE REFERENCE	50 X 4 METHODE MODIFIEE
PEPTIDES IODES	5,98	2,50
IODURES	10,81	11,16
M. I. T.	29,57	29,35
D. I. T.	45,64	42,41
T ₃ T ₄	8,00	14,58

Les courbes d'élution obtenues par la méthode de Reilly et par cette dernière modifiée, sont comparées figure n° 10. La méthode modifiée laisse apparaître un pic représentant 2,50 % du total élué.

Le rendement est alors porté à une valeur supérieure à 96 % et le résidu radioactif sur la résine est bien inférieur à 3 % (les mesures tiennent compte de la décroissance radioactive).

DISCUSSION

a) Iodures, M.I.T., D.I.T.

Les remarques restent les mêmes, la méthode n'étant modifiée qu'au stade du second éluant.

b) Iodothyronines.

Le taux des iodothyronines est encore trop élevé : 14,58 %. Les autoradiographies révèlent encore la présence en moyenne de 15 % de peptides iodés et de 30 % de D.I.T.

c) Peptides iodés.

Nous avons, grâce à l'élution par la soude normale, apparition d'un pic constitué en première approximation, exclusivement par des

peptides iodés. La mesure du Rf sur les autoradiographies de chromatographie sur papier sert à leur caractérisation.

Si l'on ajoute les 15 % de peptides élués en même temps que la thyroxine, le pourcentage de 2,50 % est alors amené à 4,70 % (cf. Tableau 8). Il faut toutefois, remarquer l'extrême difficulté d'une élution à l'état pur de ces composés.

CONCLUSIONS

Cette modification de la méthode de Reilly n'apporte en définitive, qu'une preuve supplémentaire, s'il en était besoin, de la présence de peptides iodés non élués par la méthode originale.

Si l'on compare les résultats corrigés, obtenus par la méthode de Reilly modifiée, et les pourcentages obtenus par la méthode de Blanquet-Meyniel, leur similitude est frappante (tableau n° 8).

T A B L E A U N° 8

	METHODE DE REFERENCE	METHODE MODIFIEE ET CORRIGEE
PEPTIDES IODES	5,98	4,70
IODURES	10,81	11,16
M. I. T.	29,57	29,35
D. I. T.	45,64	46,41
T ₃ T ₄	8,00	8,38

La méthode de Reilly reste toujours valable pour les raisons déjà exposées. Mais délicate, longue (48 h), on ne saurait l'envisager comme technique de routine pour le dosage des acides aminés iodés, peptides iodés et iodures.

CHAPITRE V

SÉPARATION DES COMPOSÉS IODÉS D'UN MÊME HYDROLYSAT DE THYROIDES PAR LES CINQ TECHNIQUES PRÉCÉDEMMENT ÉTUDIÉES

Nous aurions pu faire une statistique sur les 118 séparations réalisées. Cependant, il faudrait admettre que les rats ont tous les mêmes caractéristiques quelles que soient les saisons et que l'on peut matériellement réaliser, une expérience portant sur toutes les méthodes.

Une normalisation dans ce domaine est impossible surtout pour une expérimentation portant sur plusieurs années. Nous avons donc lors de chaque expérience, réalisé une colonne de référence, et une colonne expérimentale afin de rendre les résultats comparables.

Il nous a paru toutefois nécessaire de tester les cinq techniques étudiées pour la séparation des composés iodés thyroïdiens avec un même hydrolysat de thyroïde de rat. L'importance du personnel et le matériel nécessaire, nous a limité pour ces conditions expérimentales à deux expériences sur l'ensemble des techniques. Le tableau ci-après rend compte de la moyenne des pourcentages des deux séries de thyroïdes (tableau n° 9).

Nous avons constaté, sur les pourcentages et à l'observation des autoradiochromatographies de contrôle, que les résultats que nous avons commentés à chaque paragraphe, tant sur le plan qualitatif que sur le plan quantitatif, sont rigoureusement comparables aux cas étudiés.

Ces deux expérimentations complémentaires nous confirment donc dans nos conclusions générales.

	1	2	3	4	5
PEPTIDES IODEES	4,8	2,4	0	0	3,8
IODURES	13,4	16,0	15,0	13,8	13,6
M I T	27,9	27,0	25,8	27,7	26,9
D I T	45,9	48,3	51,3	44,5	45,7
IDO- THYRONINES	8,0	6,3	7,9	14,0	10,0

1_ METHODE DE REFERENCE (174) DOWEX 1X2 .

2_ METHODE SUR GEL DE DEXTRANE (157) .

3_ METHODE SUR DOWEX 50WX4 (33) .

4_ METHODE SUR DOWEX 50WX4 (209) .

5_ METHODE 4 MODIFIEE .

RENDEMENTS	98,4%	96,5%	97,1%	92,0%	98,2%
------------	-------	-------	-------	-------	-------

TABLEAU_N°9

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

La première partie de notre mémoire comprend un premier chapitre consacré à un rappel sur le métabolisme thyroïdien. Le second chapitre traite des radioisotopes et de leur utilisation dans l'exploration thyroïdienne. Le dernier chapitre de cette partie est relatif à l'exposé des méthodes de séparation des composés thyroïdiens. Nous avons essayé de brosser un tableau aussi complet que possible des différentes techniques utilisées à ce jour.

Nous avons consacré la seconde partie de ce travail à l'étude comparative de quatre méthodes de séparations des dérivés iodés thyroïdiens donnant le maximum d'informations.

Prenant la méthode des résines échangeuses d'anions comme référence, nous avons comparé nos résultats avec ceux obtenus soit avec des résines échangeuses de cations, soit des gels de dextrane.

Si nous utilisons le même hydrolysât thyroïdien avec ces différentes méthodes, nous constatons que les teneurs relatives en iodures, peptides iodés, iodotyrosines et iodothyronines varient d'une méthode à l'autre.

Nos résultats portent sur une étude effectuée avec trente hydrolysats thyroïdiens testés chacun par les quatre méthodes. L'identification et le contrôle des différents composés iodés a été réalisée systématiquement par autoradiochromatographie.

Nous avons ainsi pu juger qualitativement et quantitativement de la pureté des produits séparés. Si peu de difficultés surgissent pour la séparation des iodures et des iodotyrosines, il n'en est pas de même pour l'étude des iodothyronines et surtout des peptides iodés.

Par les deux méthodes utilisant les résines échangeuses de cations, nous obtenons, après modification de la technique une élution partielle des peptides iodés.

L'élution sur gel de dextrane ne nous a pas permis de séparer les peptides iodés des autres composés thyroïdiens.

Les séparations, y compris par la méthode de référence, des iodothyronines, T_3 et T_4 , quelles que soient les méthodes, ne sont pas probantes.

La méthode sur résines anioniques fournit les meilleurs résultats quant à l'isolement des peptides iodés. C'est une méthode facilement

reproductible d'exécution technique rapide conduisant à l'obtention de composés purs.

L'ensemble de ces recherches, portant sur 120 analyses chromatographiques sur colonnes, montre l'intérêt de codifier de façon rigoureuse les méthodes de séparation des composés iodés thyroïdiens. Cet aspect analytique est particulièrement important dans le domaine des études biologiques, si l'on veut pouvoir interpréter en toute rigueur les variations quantitatives et qualitatives des composés thyroïdiens au cours de leur métabolisme.

VU,

Le 19 décembre 1968.

Le Président de Thèse :

G. MEYNIEL.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

N° Ph. 9/68

Clermont-Ferrand,

le 3 décembre 1968.

Le Doyen :

G. MEYNIEL.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ADAMS B.A., HOLMES E.L. — *J. Soc. Chem.*, 1935, (54), 1.
- (2) ALBRIGHT E.C., LARSON F.C. et DEISS W.P. — Single dimension chromatography. Separation of thyroxin and triiodothyronine. *Proc. Soc. Exper. Biol. et Méd.*, 1953, 84, 240-244.
- (3) ALBRIGHT E.C., LARSON F.C., TUST R.H. — In vitro conversion of thyroxin to triiodothyronine by kidney slices. *Proc. Soc. Exp. biol.* (N.Y.), 1954, (86), 137.
- (4) ALEXANDER N.M. — The mechanism of iodination reactions in thyroid glands. *Endocrinology*, 1961, (68), 671.
- (5) ALEXANDER P., BLOCK R.J. — A Laboratory Manual of Analytical methods of protein chemistry. *Pergamon Press* (London England), 1960, (2), 33.
- (6) ALLISON A.C. — Identification of human serum protein binding iron copper and thyroid hormones by starch gel electrophoresis. *Experientia*, 1959, (15), 281.
- (7) ANGHILERI L.J. — Chromatographic loss of carrier free ^{131}I . *J. Appl. rad. Isot.*, 1963, (14), 427-428.
- (8) ARNAUD Y. — Journées Médicales de France et de la Communauté, 1959, (1), 671.
- (9) BAKER E.T. — De bepaling van trijoodothyronine en van thyroxine in schild Klierpoeder. *Thesis Univ.*, Utrecht, 1964.
- (10) BARAUD J., GENEVOIS L. — *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1955, 1499.
- (11) BARKER S.B., HUMPHREY M.J., SOLEY M.H. — The clinical determination of protein-bound iodine. *J. Clin. Invest.*, 1951, (30), 55-62.
- (12) BAUMANN E. — *Z. Physiol. Chem.*, 1895, (21), 319.
- (13) BAUMANN E. — *Münch Med Wschr*, 1896, (43), 309.
- (14) BAUMANN E. et ROOS E.Z. — *Physiol. Chem.*, 1895, (21), 481.
- (15) BAYET M. — Physique nucléaire. *Masson Ed.*, 1960.
- (16) BEALE D., WHITEHEAD J.K. — A preliminary investigation of the levels of 3-monoiodotyrosine and 3,5-diiodotyrosine in human blood plasma using double isotope dilution technique. *Clin. Chem. Acta*, 1960, (5), 150-152.
- (17) BECKERS C., de VISSCHER M. — Etude des protéines thyroïdiennes des cancers de la glande thyroïde. *Ann. d'Endoc.*, 1960, (21), 765.

- (18) BENUA R.S., DOBYNS B.N. — Iodinated compounds in the serum disappearance of radioactive iodine from the thyroid and clinical response in patients treated with radioactive iodine. *J. Clin. Endocrinol. and Metabolism*, 1955, (15), 118-130.
- (19) BENSON J.V., RICHARD J.R., JONES T., CORNICK J., PATTERSON J.A. — Accelerated automatic chromatographie analysis of peptides on a spherical resin. *Biochem.*, 1966, (16), 91-106.
- (20) BESS A.F. — *Acta Electronica*, 1956, (1), 99.
- (21) BESS A.F. — *Acta Electronica*, 1959, (3), 295.
- (22) BLANC D. — Détecteurs de particules (Masson Ed.), 1959.
- (23) BLANC D., AMBROSINO G. — Eléments de physique nucléaire (Masson Ed.), 1960.
- (24) BLANQUET P., MEYNIEL G., BERGER G., CROIZET M., GAILLARD G. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1965, (1), 99.
- (25) BLANQUET P. — *Actes Conf. Intern. Genève*, 1955, (10), 389.
- (26) BLANQUET P., DUNN R.W., TORIAS C.A. — *Arch. Biophys. Biochim.*, 1955, (58), 502.
- (27) BLANQUET P., MEYNIEL G., BERNARD-GRIFFITHS C., BELIN J., RIOLLET H. — *J. de médecine de Bordeaux*, 1961, (8), 933.
- (28) BLANQUET P., MEYNIEL G., MOUNIER J., STOLL R., MORAUD R. — *Ann. Endoc.*, Paris, 1957, (18), 864.
- (29) BLANQUET P., MEYNIEL G., MOUNIER J., TOBIAS C.A. — A propos des résines échangeuses d'anions Dowex 1 et 2. Séparation immédiate de l'iode organique et de l'iode minéral. Dosage rapide des acides aminés iodés marqués au moyen de ^{131}I . *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1957, (39), 419.
- (30) BLANQUET P., MEYNIEL G., SAVOIE J.C. — Résines échangeuses d'ions et métabolisme thyroïdien. Déterminations quantitatives portant sur le plasma. *C.R. Acad. des Sciences*, 1960, (250), 217-219.
- (31) BLAU N.F. — The determination of thyroxine in the thyroid gland. *J. Biol. Chem.*, 1933, (102), 269.
- (32) BLAU N.F. — *J. Biol. Chem.*, 1935, (110), 351.
- (33) BLOCK R.J., MANDL R.H. — Automatic analysis of iodoaminoacids and of iodide in digests of iodinated proteins. *Anal. New York Academy of Sciences*, 1961, 87-95.
- (34) BLOCK R.J., MANDL R.H., HOWARD H.W., BANER C.D., ANDERSON D.W. — The curative action of iodine on soybean goiter and the changes in the distribution of iodoamino acids in the serum and in thyroid gland digests. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1961, (93), 15.
- (35) BLOCK R.J., WERNER S.C., MANDL R.H. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1958, (73), 9.
- (36) BLOCK R.J., WERNER S.C., MANDL R.H., ROW V.V., RADICHEVICH I. — The probable presence of diiodotyrosine and monoiodotyrosine in human serum a discrepancy between the distribution of iodo compounds when estimated by ^{131}I and by ^{127}I . *Arch. Biochem. Biophys.*, 1960, (88), 104.
- (37) BLUM F. — *Verhandl Kong in med.*, 1897, (15), 226.
- (38) BOWDEN C.H., MAC LAGAN N.F., WILKINSON J.H. — *Biochem. J.*, 1955, (59), 93.

- (39) BRAASCH J.W., FLOCH E.V., ALBERT A. — A quantitative method for the separation of the iodinated amino acids of thyroid tissus. *Endocrinol*, 1954, (55), 768-776.
- (40) BRAASCH J.W., ALBERT A., KEATING F.R., BLACK J.R., BLACK B.M. — A note on the iodinated constituents of normal thyroids and of exophthalmic goiters. *J. Clin. Endocrinol and metabolism*, 1955, (15), 732-738.
- (41) BRAND E., KASSEL B.J. — *J. Biol. Chem.*, 1939, (131), 489.
- (42) BRODIE B.B., AXEKOD J., SHORE P.A., UNDEFRIEND S. — *J. Biol. Chem.*, 1954, (208), 741.
- (43) BROWN B.L., REITH W.S., TAMPION W. — The use of butanol extracts of human plasma for the determination of iodothyrosines. *Biochem. J.*, 1965, (97), 30.
- (44) BROWN B.L., REITH W.S., TAMPION W. — A method of separation of dinitrophenyl derivatives of iodothyrosine and thyroid hormones by paper chromatography and gel filtration on sephadex column. *Biochem. J.*, 1965, (97), 31 p.
- (45) CARR E.A., J.R., BEIERWALTES W.H., SPAFFORD N.R., DUNCAN L.L., STAMBANGH R.A. — Activity of iodothyrosine deshalogenase in « normal » and diseased human thyroids. *J. Clin. Endocr.*, 1959, (19), 1282.
- (46) CASALS J.B. — Cromatographia de las protrinas sericas en DEAE celulosa. Un estudio comparativo con soluciones compensadoras de acetatos Y fosfatos. *Laboratorio*, 1964, (38), [223], 1-9.
- (47) CIBA FOUNDATION. — Regulation and mode of action of thyroid hormons. *Colloquia on endocrinology*, 1957, (10), J. et A. Churchill, Edit., London.
- (48) COMAR D., BLANQUET P., RIVIERRE R., KELLERSHONN C. — Dosage de l'iode lié aux différentes fractions protéiques plasmatiques au moyen de l'analyse par radioactivation. *An. Fac. Sc. Clermont-Fd*, 1963, (14), 23.
- (49) CONSDEN R. — Partition chromatography on paper its scope and application. *Nature*, London, 1948, (162), 359.
- (50) CONSDEN R., GORDON A.H., MARTIN A.J.P. — *Biochem. J.*, 1944, (38), 224.
- (51) CROIZET M. — *Thèse de Pharmacie*, Bordeaux, 1963.
- (52) CROUTHAMEL C.E. — Applied gamma rey spectrometry. *Pergamon Press*, 1960.
- (53) CURIE J., JOLIOT F. — *C.R. Acad. Sc.*, 1934, (198), 254.
- (54) DANIEL D.M., PLASKETT L.G., PRATT O.E. — Radioactive iodo-protein in thyroid lymph and blood. *Biochem. J.*, 1966, (100), 622-630.
- (55) DENT C.E. — *Biochem. J.*, 1948, (43), 169.
- (56) DERRIEN Y., MICHEL R., ROCHE J. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1948, (2), 454.
- (57) DESCHAMPS J. — *Thèse de médecine*, Marseille, 1964.
- (58) DOBYNS B.M. — *Tr. Am. Goiter Assn.*, 1951, 239.
- (59) DOBYNS B.M., BARRY S.R. — The isolation of iodinated amino acids from thyroid tissus by means of starch column chromatography. *J. Biol. Chem.*, 1953, (204), 517-531.

- (60) DOCUMENTA GEIGY. — Physiopathologie thyroïdienne. *Acta Clinica* n° 3.
- (61) DOWBEN R.M. — Modified resin method for determination of radioiodine conversion radio. *J. Labor. and Clin. Med.*, 1960, (55), 132-135.
- (62) DUQUESNE M., GREGOIRE R., LEFORT M. — Travaux pratiques de physique nucléaire et de radiochimie, Masson Ed., 1960.
- (63) DUMAZERT C., SANTONI G. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1939, (21), 1048.
- (64) ELMER A.W., LUCKYNSKIZ, SCHEPSM. — Sur la thyroxinémie normale chez l'homme et chez l'animal. *Compt. Rend. Soc. de Biol.*, Paris, 1934, (115), 1714-1718.
- (65) ELMER A.W., RYCHLIK W., SCHEPS M. — L'hyperthyroxinémie dans la thyrotoxicose. *Compt. Rendu Soc. de Biol.*, Paris, 1934, (117), 533-534.
- (66) ESCALIER M. — Contribution à l'étude de la séparation des composés iodés du plasma par les résines échangeuses d'ions. *Thèse*, Marseille, 1966.
- (67) FAWCETT, KIRKWOOD. — *J. Biol. chem.*, 1954, (209), 249.
- (68) FINK R.M., DENT C.E., FINK K. — Application of filter paper partition chromatography to radioactive tracer studies. *Nature*, 1947, (160), 801.
- (69) FINK R.M., DENT C.E., FINK K. — *Nature*, 1947, (166), 901.
- (70) FINK K., FINK R.M. — The formation of monoiodothyrosine from radioiodine in the thyroid of rat and man. *Science*, 1948, (108), 358.
- (71) FLETCHER K. — *Biochem. J.*, 1957, (67), 140.
- (72) FLETCHER K., STANLEY P.G. — *Nature*, 1955, (175), 730.
- (73) FOSTER G.L. — *J. Biol. Chem.*, 1929, (83), 345.
- (74) FRIEDEN E., LIPSETT M.B., WINZLER R.J. — *Science*, 1948, (107), 353.
- (75) FROMAGEOT C., JUTISZ M., LEDERER E. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1948, (2), 487.
- (76) FURNAM A.O., KOBIZEV E.I., BADNIKOV V.K. — *Dokl. Tshka*, 1965, (109), PTI 259 65.
- (77) GAILLARD G. — Facteurs physico-chimiques dans la radiochromatographie mono dimensionnelle sur papier : cas des iodotyrosines et des iodothyronines. *Thèse*, Clermont-Ferrand, 1962.
- (78) GALTON V.A., PITT-RIVERS R. — A quantitative method for the separation of thyroid hormones and related compounds from serum and tissues with an ormon and exchange resin. *Biochem. J.*, 1959, (72), 310-313.
- (79) GALTON V.A., PITT-RIVERS R. — Thyroid hormone metabolism in the Kidney. *Biochem. J.*, 1959, (72), 314-318.
- (80) GALTON V.A., PITT-RIVERS R. — The identification of the acetic acid analogues of thyroxine and triiodothyronine in mammalian tissues. *Biochem. J.*, 1959, (32), 319-321.
- (81) GAUTHIER P. — *Acta Electronica*, 1959, (3), 285.
- (82) GELOTTE B. — Studies on gel filtration sorption properties of the bed material sephadex. *J. Chromatog.*, 1960, (3), 330-342.

- (83) GENEVOIS L., BARRAUD J. — *Chim. Analyt. Fr.*, 1956, (38), 87.
- (84) GENNES L. de, DELTOUR G. — *Presse Med.*, 1953, (61), 996.
- (85) GLEASON G.L. — *J. Biol. Chem.*, 1955, (213), 837.
- (86) GORDON A.H., GROSS J., O'CONNER D., PITT-RIVERS R. — Nature of the circulating thyroid hormone - plasma protein complex. *Nature*, 1952, (169), 19-20.
- (87) GREER M.A. — The influence of the central nervous system on the control of thyrotrophin secretion. *Ciba Found. Coll. Endocr.*, 1957, (10), 34.
- (88) GRIMBERG B. — *Acta Electronica*, 1959, (3), 211.
- (89) GRONKVIST K.E., HELBERG H. — *Farmacentisk Revy*, 1951, (50), 189.
- (90) GROSS J. — Thyroid hormones. *Brit. Med. Bull.*, 1954, (10), 218-223.
- (91) GROSS J., LEBLOND C.P. — *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1951, (76), 686.
- (92) GROSS J., LEBLOND C.P. — *Endocrinology*, 1951, (48), 714.
- (93) GROSS J., LEBLOND C.P., FRANKLIN A.E., QUASTEL J.H. — Presence of iodinated aminoacids in inhydrolyzed thyroid and plasma. *Science*, 1950, (111), 605-608.
- (94) GROSS J., MARTIN A.J.P. — *Biochem. J.*, 1952, (51), Proc. XXVII.
- (95) GROSS J., PITT-RIVERS R. — 3 : 5,3' triiodothyronine, isolation from thyroid gland and synthesis. *Biochem. J.*, 1953, (53), 645-650.
- (96) GROSS J., PITT-RIVERS R. — *Lancet*, 1951, (2), 766.
- (97) GROSS J., PITT-RIVERS R. — Identification of 3,5 3' L-triiodothyronine in human plasma. *Lancet*, 1952, (1), 439-441.
- (98) GROSS J., PITT-RIVERS R. — Experimental study of thyroid metabolism with radioactive iodine. *Brit. Med. Bull*, 1952, (8), 136-141.
- (99) GROSSMAN A., GROSSMAN G.F. — Protein-bound iodine by alkaline incineration and a method for producing a stable cerate color. *J. Clin. Endocr. and Metabolism*, 1955, (15), 354-361.
- (100) GUEBEN G. — Phénomènes radioactifs et introduction à la physique nucléaire, Dunod Edit.
- (101) HAMILTON P.B. — Ion exchange chromatography of amino acids. Effect of resin particle size on column performanee. *Anal. Chem.*, 1958, (30), 914-919.
- (102) HAMILTON J.G., SOLEY M.H. — *Am. J. Physiol.*, 1939, (127), 557.
- (103) HARINGTON C.R. — *Biochem. J.*, 1926, (20), 300.
- (104) HARINGTON C.R. — *Endocrinology*, 1951, (49), 401.
- (105) HARINGTON C.R., BARGER G. — *Biochem. J.*, 1927, (21), 169.
- (106) HARRINGTON C.R., PITT-RIVERS R.V. — Mono-iodotyrosine. *Biochem. J.*, 1944, (38), 320.
- (107) HARINGTON C.R., PITT-RIVERS R.V. — *Biochem. J.*, 1945, (39), 157.
- (108) HARINGTON C.R., RANDALL S.S. — Observations on the iodine-containing compounds of the thyroid gland. Isolation of di-3 : 5 di-iodotyrosine. *Biochem. J.*, 1929, (23), 373.

- (109) HARINGTON G.R., RANDALL S.S. — *Biochem. J.*, 1931, (25), 1032.
- (110) HARRIS G.W., WOODS J.W. — The effect of electrical stimulation of the hypothalamus or pituitary gland on thyroid activity. *J. Physiol.* (Lond.), 1958, (143), 246.
- (111) HELLMAN E.S., TSCHUDY R.P., ROBBINS J., RALL J.E. — *J. Clin. Endoc. Metab.*, 1963, (23), 1185-1191.
- (112) HERRIOTT R.M. — Inactivation of pepsin by iodine - isolation of crystalline 1 mono-iodotyrosine. *J. Gen. Physiol.*, 1941, (25), 185.
- (113) HERTZ S.A., ROBERTS H., EVANS R.D. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1938, (38), 510.
- (114) HIRD F.J.R., TRIKOJNS V.M. — *Australian J. Sc.*, 1948, (10), 185.
- (115) HIRS C.H.W., MOORE S., STEIN W.H. — *J. Biol. Chem.*, 1952, (195), 669.
- (116) HIRONORI, NAKAJIMA MASAOKI KURANIOCHI, TOJI HORIGUCHI SEIJKUBO. — *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1966, (26), [1], 99-103.
- (117) HOCMAN G. — Use of sephadex in the chromatography of thyroxine containing compounds - A critique. *J. Chromatog.*, 1966, (21), [3], 413-418.
- (118) HUGUES E. — *J. Chem. Soc.*, 1949, Supp. 400.
- (119) HURLBERT R.B., SCHMITZ H., BRUMM A.F., POTTER V.R. — Nucleotide Metabolism - Chromatographic separation of acid-soluble nucleotides. *J. Biol. Chem.*, 1954, (209), 23-39.
- (120) HUTCHINSON R. — *J. Physiol.*, 1896, (20), 474.
- (121) INGBAR S.H. — The interaction of the thyroid hormones with the proteins of human plasma. *Ann. N.Y. Acad. Sc.*, 1960, (86), 440.
- (122) INGBAR S.H., DOWLING J.T., FRANKEL N. — The purification of thyronine - binding protein by ion-exchange resins. *Endocrinology*, 1957, (61), 321-326.
- (123) JACOBSSON L., WIDSTRÖN G. — Separation of iodine compounds in serum by gel filtration. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1962, (14), 285-288.
- (124) JAMES T.H., HIGGINS G.C. — Fundamentals of photographic theory. J. Wiley and son Ed., 1948.
- (125) JENKINSON J.S., YOUNG J.D. — Comparative studies of iodine 131 and iodine 125 labeled triiodothyronine in resin uptake studies. *J. Nucl. Med.*, 1966, (7), [4], 281-286.
- (126) JENSEN R., BLANQUET P., CROIZET M., BAGHDIAINTZ A., MEYNIEL G., DUMORG F. — Une méthode simple pour la séparation et l'analyse des peptides. Application à quelques peptides thyroïdiens. *Bull. Soc. Pharm.*, Bordeaux, 1966, 104, (3), 183-186.
- (127) JOLIOT F., BOVET D., COURRIER R., HOREAU A., POUMEAU-DELILLE G., SüE P. — *C.R. Soc. Biol.*, 1945, (139), 278.
- (128) JONES J., SCHULTZ J.S. — Identification of thyroidal iodoamino acids by gel filtration and automated 127I determination. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1966, (26), [9], 975-985, Eng.
- (129) JOURDE H. — L'apport des résines échangeuses d'ions dans l'exploration fonctionnelle de l'hormonogénèse thyroïdienne - étude expérimentale et statistique : comparaison avec l'index globulaire H/P. Thèse, Clermont-Ferrand, 1963.

- (130) KENDALL E.C. — *J. Biol. Chem.*, 1915, (20), 501.
- (131) KENDALL E.C. — The isolation in crystalline form of the compound containing iodine which occurs in the thyroid. *J.A.M.A.*, 1915, (64), 2042.
- (132) KENDALL E.C. — *Trans. Assoc. Am. Phys.*, 1915, (30), 420.
- (133) KENDALL E.C. — Thyroxine, *American Chemical Society monograph series*, N.Y., 1929.
- (134) KENNEDY T.H., PURVES H.D. — *Austr. J. Biol. Sc.*, 1956, (9), 1586.
- (135) KENNEDY T.H. — The quantitative determination of iode aminoacids of thyroid tissue. *Australian J. Biol. Sc.*, 1958, (11), 106.
- (136) KESTON A.S. — The Schardinger enzyme in biological iodination. *J. Biol. Chem.*, 1944, (153), 335.
- (137) KLEVIT H.D., EBERLEIN W.R., BONGIOVANNI A.M. — The iodoproteins in the iodotyrosyl coupling defect. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 1965, (25), [5], 585-592.
- (138) KOICHI CHITANI, YOSHIHITO YAOI (Japan). — Methods of fractionating peptides. *Tampakushitsu Kakusan Koso*, 1965, (10), [3], 250-310.
- (139) KONTAXIS N.E., PICKERING D.E. — *J. Clin. Endocr.*, 1958, (18), 774.
- (140) LACY P.E., ORVIS A.L., ALBERT A. — Studies on in vitro perfusion of beef and dog thyroid glands using radioiodine. *Endocrinology*, 1955, (57), 482-491.
- (141) LAIDLAW J.C. — Nature of the circulating thyroid hormone. *Nature* (London), 1949, (164), 927.
- (142) LAJUS A. — Etude du métabolisme thyroïdien au moyen de l'iode radioactif associé aux méthodes chromatographiques. *Thèse d'université Pharmacie*, Bordeaux, 1962.
- (143) LAMARQUE P., THIBAUD E., MERCIER J. — Etude radioactive de l'électrophorégramme du sérum de malades traités par l'iode radioactif I 131. *Conférence internationale sur les radioisotopes dans la recherche scientifique*, Unesco, Paris, 1957.
- (144) LAMARQUE P., THIBAUD E. — Les variations de radioactivité de l'électrophorégramme du sérum au cours du traitement par l'iode 131. *Colloque de biophysique*, Bordeaux, 1958, (10), 24.
- (145) LARSON R.A., ALBRIGHT E.C. — *Endocrinol.*, 1955, (56), 737.
- (146) LARSON F., DEISS W.P., ALBRIGHT E.C. — Localization of protein - bound radioactive iodine by filter paper electrophoresis. *Science*, 1952, (115), 626-627.
- (147) LEBLOND C.P., PUPPEL I.D., RILEY E., RADIKE M., CURTISS G.M. — *J. Biol. Chem.*, 1946, (162), 275.
- (148) LEBLOND C.P., SÜE P. — *C.R. Soc. Biol.*, 1940, (133), 543.
- (149) LEBŒUF G., BONGIOVANNI D., STEKKER D., EBERLEIN W.R. — Immunologie and thyroid function studies in euthyroid children with goiter. *J. Pediat.*, 1961, (58), 477.
- (150) LELAND J.P., FOSTER G.L. — A method for the determination of thyroxine in the thyroid. *J. Biol. Chem.*, 1932, (95), 165.
- (151) LEMMON R.M., TARPEY W., SCOTT K.G. — Paper chromatography in synthetic organic chemistry. Microgram scale syntheses of

- labeled monoiodotyrosine, diiodotyrosine and thyroxine. *J. Ann. Chem. Soc.*, 1950, (72), 758-761.
- (152) LERNER S.R. — Chromatography of iodinated amino acids on sulfonated polystyrene resins. *Federation Proc.*, VT (PT I), 1960, (19), 171.
- (153) LE ROSEN A.L. — A method for standardization of chromatographic analysis. *J. Ann. Chem. Soc.*, 1942, (64), 1905, 1907.
- (154) LEWALLEN C. — Evaluation of thyroid and parathyroid functions. In *Semderman F. W. and Semderman F.W.*, Philadelphia (eds), 1963, p. 37.
- (155) LISSITZKY S. — Biochimie des acides aminés iodés marqués par ^{131}I dans le corps thyroïde. *Thèse de doctorat Sciences*, Paris, 1952.
- (156) LISSITZKY S., BISMUTH J. — Quantitative determination of the concentrations of ^{131}I -thyroxine and ^{131}I -triiodothyronine in the serum by filtration on dextran gel (Sephadex). *J. Clin. Chem. Acta*, 1963, (8), 269-276.
- (157) LISSITZKY S., BISMUTH J., ROLLAND M. — Separation des composés iodés du sérum et de la thyroïde par filtration sur gel de dextrane (Sephadex). *Clin. Chim. Acta*, 1962, (7), 183-189.
- (158) LISSITZKY S., COMAR D., RIVIERE R., CODACCIONI J.L. — *Rev. France d'études clin. et biol.*, 1965, (6), 631.
- (159) LISSITZKY S., GREGOIRE J., GREGOIRE J., LIMOZIN M. — The presence and in vitro activity of free iodinated peptides in the thyroid gland of mammals and man. *General and comparative Endocrinologie*, 1961, (1), 519-533.
- (160) LISSITZKY S., HANEY J.F. — Dialysis and chromato electrophoresis for the separation of thyroidal iodo compounds. *Arch. Biochim. Biophys.*, 1962, (99), 1-7.
- (161) LISSITZKY S., LASRY S. — Separation sur résine échangeuse d'ions avec élution par gradient d'acidité des acides aminés iodés thyroïdiens et de 5-hydroxy-3-iodotyrosine. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1958, (40), 609-618.
- (162) LISSITZKY S., ROQUES M. — Oxydation de la tyrosine, de la thyronine et de leurs dérivés iodés. Action du système acide ascorbique-ions ferreux-oxygène. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1957, (39), 521.
- (163) LUDWIG W., VON MUTZENBECHER P. — *Z. Physiol. Chem.*, 1936, (244), 4.
- (164) LUDWIG W., VON MUTZENBECHER P. — Die darstellung von thyroxin monjodthyrosin und diiodthyrosin aus jodiertem eiwciss. *Z. Physiol. Chem.*, 1939, (258), 195.
- (165) LUDWIG W., VON MUTZENBECHER P. — *Z. Physiol. Chem.*, 1939, (261), 253.
- (166) MAKOWETZ E., MULLER K., SPITZY H. — Separation and determination of thyroid hormones in the nanogram range based on the sorption properties of Sephadex. *Microchem. J.*, 1966, (10), 194-201.
- (167) MANDL R.H., BLOCK R.J. — Methods for the qualitative semi quantitative and quantitative determination of iodoamino acids and of inorganic iodide in iodoprotein digests and in human serum. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1959, (81), 25-35.
- (168) MANN W., LEBLOND C.P., WARREN S.L. — *J. Biol. Chem.*, 1942, (142), 905.
- (169) MANSART P. — *Thèse Médecine*, Marseille, 1964.

- (170) MARINE D., ROGOFF J.M. — *J. Pharm. Exp. Therap.*, 1916, (81), 431.
- (171) MAYBERRY W.E., ASTWOOD E.B. — The effect of propylthiouracil on the intrathyroid metabolism of iodine in rats. *J. Biol. Chem.*, 1960, (235), 2977.
- (172) MAYER S.W., TOMPKINS E.R. — Ion exchange as a separation methods. A theoretical analysis of the columns separations process. *J. Am. Chem. Soc.*, 1947, (69), 2866.
- (173) MEYNIEL G. — L'utilisation des résines échangeuses d'ions pour l'étude de la cinétique de formation des tyrosines et thyronines iodées dans la glande thyroïde. *Thèse Sciences*, Bordeaux, 1958.
- (174) MEYNIEL G., BLANQUET P., BERGER J.A., CROIZET M., GAILLARD G. — Séparation des composés iodés minéraux et organiques de la glande thyroïde sur résine échangeuse d'anions Dowex 1X2. *Bulletin Société Chimie Biologie*, 1965, (47), [1], 99-106.
- (175) MEYNIEL G., BLANQUET P., MOUNIER J., ESTIBOTTE M. — Sur la séparation qualitative et quantitative des acides aminés iodés thyroïdiens par chromatographie sur résine échangeuse d'anions (Dowex). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1958, (40), 369-377.
- (176) MILLER G., PAULIN R., MANSART P. — Etude du taux des iodoprotéines du sang circulant après traitement des hyperthyroïses par l'iode radioactif. *Rev. franç. d'Endocr. Clin.*, 1962, (3), 575-580.
- (177) MILLER G., TARANGER J.M., CREVAT A., DESTRIEATS R., VAGUE J. — En séparation des composés iodés plasmatiques par la méthode de Blanquet-Meyniel. *Ann. d'Endocr.*, 1961, (22), 87-91.
- (178) MILLER W.H., ANDERSON C.W., MADISON R.K., SALLEY D.J. — *Science*, 1944, (100), 340.
- (179) MITCHELL M.L. — Resin uptake of radiothyroxine in sera from non-pregnant and pregnant women. *J. Clin. Endocr. Metab.*, 1958, (18), 1437-1440.
- (180) MOORE S., SPACKMAN D.H., STEIN W.H. — Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. *Ann. Chem.*, 1958, (30), 1185-1191.
- (181) MOORE S., STEIN W.H. — Photometric, ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *J. Biol. Chem.*, 1948, (176), 367.
- (182) MOORE S., STEIN W.H. — *J. Biol. Chem.*, 1951, (192), 663.
- (183) MOORE S., STEIN W.H. — *J. Biol. Chem.*, 1954, (211), 893.
- (184) MORIYA H., YAMAZAKI K., FUKUSHIMA H. — Use of Sephadex G 10 and G 15 gel filtration for fractionation of a certain peptide. *J. Biochem.*, Tokyo, 1966, (60), 225-227.
- (185) MOUGEY E.H., MASON J.W. — *J. Lab. Clin. Med.*, 1962, (59), 672-680.
- (186) MOUGEY E.H., MASON J.W. — Separation of some iodoamino acids and iodide by gel filtration. *Anal. Biochem.*, 1963, (6), 223-233.
- (187) MOUNIER J., BLANQUET P., MEYNIEL G. — *Bull. Soc. Pharm.*, Bordeaux, 1957, (96), 3.
- (188) MULLER K., SKRUBE H., SPITZY H. — Über den katalytischen einfluss der schilddrüsen hormone und verwandter substanzen auf die reduktion von cer (IV) sulfat durch arsenige säure. *Mikrochim. Acta*, 1962, 1081-1088.

- (189) MULLER K., SKRUBE H., SPITZY H. — Quantitative untersuchungen über die papier chromatographische wandering der schilddrüsenhormone. *Mikrochim. Acta*, 1963, 297-304.
- (190) MYERS W.C., VANDERLEEDEN J.C. — Radioiodine 125. *J. Nucl. Med.*, 1960, (1), 149.
- (191) OSWALD A.Z. — *Physiol. Chem.*, 1899, (27), 14.
- (192) PASCAL P. — *Traité de Chimie minérale T. I et IV*, Masson Ed., Paris, 1949-1952.
- (193) PETERSON E.A., SOBER H.A. — 1960, in : A Laboratory Manual of analytical methods of protein chemistry (1), 88-102, ALEXANDER P. and BLOCK R.J., Eds Pergamon press London.
- (194) PETERSON D.H., REINEKE L.M. — The chemistry of circulin : chromatographie isolation of the amino acid constituents with powdered cellulose. *J. Biol. Chem.*, 1949, (181), 95-108.
- (195) PITT-RIVERS R. — The chemical assay of thyroxine and other substances with thyroïdal activity in hormone Assay New York, Academic Press, Inc., 1950, p. 1513.
- (196) PITT-RIVERS R. — Iodine metabolism in the thyroid gland of the rat. *Biochem. J.*, 1962, (82), 108-111.
- (197) PITT-RIVERS R., HUBBLE D., HOATHES W.H. — A chromatographic study of thyroïdal iodine metabolism in nontoxic nodular goiter. *J. Clin. Endocr.*, 1957, (17), 1313.
- (198) PITT-RIVERS R., RALL J.E. — Radioiodine equilibrium studies of thyroid and blood. *Endocrinology*, 1961, (68), 309.
- (199) PITT-RIVERS R., SACKS B.I. — Separation of iodinated tyrosines and thyroxine from serum. *Biochem. J.*, 1962, (82), 111.
- (200) PITT-RIVERS R., TATA J.R. — The thyroid hormones. *Pergamon press I vol.*, 1959.
- (201) PITT-RIVERS R., TROTTER W.R. — The thyroid gland. *Butterworths*, Londres, 1964.
- (202) PITT-RIVERS R., WOLFF J. — *Endocrinology*, 1959, (64), 841.
- (203) PONCHON G., VAN DEN SCHRIECK H.G., DE VISSCHER M. — Radiochromatographie sur Dowex des acides aminés iodés du sérum. *J. Pharm.*, Belgique, 1963, (18), 547-556.
- (204) PORATH J. — Gel filtration of proteins, peptides and aminoacides. *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, (39), 193-207.
- (205) PORATH J., FLODIN P. — Gel filtration : A method for desalting and group separation. *Nature*, 1959, (183), 1657-1659.
- (206) RABEN M.S. — Micro determination of iodine employing radioactive iodine. *Analyt. Chem.*, 1950, (22), 480.
- (207) RABEN M.S. — *Endocrinol.*, 1949, (45), 296.
- (208) RALL J.E. — Iodine compounds in the blood and urine of man. *J. Clin. Endocrinol.*, 1950, (10), 996-1006.
- (209) REILLY W.A., SEARLE G.L., SCOTT K.G. — Resin column chromatography by Dowex 50X4 of I 131 labeled iodoamino acids in human serum. *Metabolism. Clin. and Exptl.*, 1961, (10), 869-873.
- (210) REITH W.S., BROWN B.L. — Separation of iodotyrosines as dinitrophenyl (3H) derivative by thin-layer chromatography followed by electrophoresis on Sephadex. *Biochem. J.*, 1966, (100), [1], 10 p.

- (211) ROBBINS J., RALL J.E. — Effects of triiodothyronine and other thyroxine analogues on thyroxine-binding in human serum. *J. Clin. Invest.*, 1955, (34), 1331.
- (212) ROBBINS J., RALL J.E. — Proteins associated with the thyroid hormones. *Physiol. Rev.*, 1960, (40), 415-489.
- (213) ROBBINS J., RALL J.E., CONDLIFFE P.G. — The thyroid-stimulating hormones and the iodine-containing hormones; in Gray C.H. and Bacharach A.L. (Eds), *Hormones in blood*, pp. 49-147, Londres et New York, Acad. Press, 1961.
- (214) ROCHE J., JUTISZ M., LISSITZKY S., MICHEL R. — *Compt. Rend. Acad.*, 1950, (231), 723.
- (215) ROCHE J., JUTISZ M., LISSITZKY S., MICHEL R. — *Biophys. Biochem. Acta*, 1951, (7), 257.
- (216) ROCHE J., LISSITZKY S., MICHEL R. — Caractérisation des iodohistidines dans les protéines iodées (thyro-globuline et iodo-globuline). *Biophys. Biochem. Acta*, 1952, (8), 339-345.
- (217) ROCHE J., LISSITZKY S., MICHEL R. — Sur la présence de la triiodothyronine dans la thyroglobuline et sur sa biosynthèse. *Biochem. Biophys. Acta*, 1953, (11), 220-226.
- (218) ROCHE J., LISSITZKY S., MICHEL R. *Methods of Biochem. Anal.*, 1954, (1), 243.
- (219) ROCHE J., LISSITZKY S., MICHEL R., MICHEL O. — *Biochem. Biophys. Acta*, 1951, (7), 439.
- (220) ROCHE J., MICHEL R. — Dosage calorimétrique de la thyroxine, de la diiodotyrosine et de la monoiodotyrosine : application aux protéines iodées. *Biochem. Biophys. Acta*, 1947, (1), 335-356.
- (221) ROCHE J., MICHEL R. — *Exp. Ann. Biochem. Med.*, 1948, 9^e série, 127.
- (222) ROCHE J., MICHEL R. — *Advances in protein. Chem.*, 1951, (4), 253-296.
- (223) ROCHE J., MICHEL R. — Hormones thyroïdiennes et iodoprotéines naturelles ou artificiellement iodées. *Actualités pharmacol.*, 1953, 6^e série.
- (224) ROCHE J., MICHEL R. — *Exp. Ann. Biochem. Med.*, 1955, 17^e série, 97.
- (225) ROCHE J., MICHEL R. — *Physiol. Rev.*, 1955, (35), 583.
- (226) ROCHE J., MICHEL R. — Hormone biosynthesis and metabolism ; nature and metabolism of thyroid hormones. *Recent progr. hormone Res.*, 1956, (12), 1.
- (227) ROCHE J., MICHEL R. — *Biol. Med.*, 1956, (45), 481.
- (228) ROCHE J., MICHEL R. — Radioisotopes artificiels en médecine et applications biologiques de l'iode radioactif. *Isotopes radioactifs*, Ed. Masson et Cie. Rapport présenté au 32^e congrès français de Médecine, Lausanne, 1959.
- (229) ROCHE J., MICHEL R. — On the peripheral metabolism of thyroid hormones. *Ann. N.Y. Acad. Sc.*, 1960, (86), 454.
- (230) ROCHE J., MICHEL R., CLOSON J., MICHEL O. — Sur la sulfo-conjugaison hépatique de la 353' triiodo-L-thyronine et la présence d'un ester sulfurique de cette hormone dans la bile et le plasma. *Biochem. Biophys. Acta*, 1959, (33), 461.

- (231) ROCHE J., MICHEL R., GORBMAN A., LISSITZKY S. — Présence d'un enzyme spécifique dans la désiodation des iodotyrosines (MIT, DIT) dans la glande thyroïde. *Biochem. Biophys. Acta*, 1953, (12), 570.
- (232) ROCHE J., MICHEL R., JOUAN P. — *Coll. on Endocrinol. Ciba Foundation*, 1957, (10), 168, J. et A. Churchill, edit., London.
- (233) ROCHE J., MICHEL R., JOUAN P., WOLF W. — *Bull. Soc. Chem. Biol.*, 1955, (37), 819.
- (234) ROCHE J., MICHEL R., JOUAN P., WOLF W. — *Endocrinology*, 1956, (59), 425.
- (235) ROCHE J., MICHEL R., LAFON M. — Sur la formation de la thyroxine et de ses précurseurs dans les iodoprotéines. *Biochem. Biophys. Acta*, 1947, (1), 453-466.
- (236) ROCHE J., MICHEL R., MICHEL O., DELTOURG, LISSITZKY S. — *Biochem. Biophys. Acta*, 1951, (6), 572.
- (237) ROCHE J., MICHEL R., NUNEZ J. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1955, (37), 809.
- (238) ROCHE J., MICHEL R., NUNEZ J. — Sur la présence de la 3 : 3' : 5'-triiodothyronine dans le sang de rat. *Comptes rendus des séances soc. biol.*, 1956, (150), 20-24.
- (239) ROCHE J., MICHEL R., NUNEZ J. — Sur la présence des 3 : 3' diiodothyronine et 3 : 3' : 5' triiodothyronine dans la thyroglobuline de porc. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1958, (40), 361-368.
- (240) ROCHE J., MICHEL R., WOLF W. — *C.R. Acad. Sc.*, 1954, (239), 597.
- (241) ROCHE J., MICHEL R., WOLF W. — *C.R. Acad. Sc.*, 1955, (240), 251.
- (242) ROCHE J., MICHEL R., WOLF W. — *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1957, (462), 464-468.
- (243) ROCHE J., MICHEL R., WOLF W., NUNEZ J. — *Biochem. Biophys. Acta*, 1955, (13), 149.
- (244) ROCHE J., PAVLOVIC M., MICHEL R. — Culture in vitro de la glande thyroïde de jeunes rats et biosynthèse des hormones thyroïdiennes. *Biochem. Biophys. Acta*, 1957, (24), 489.
- (245) ROSENBERG I.N. — Column chromatography of thyroid gland hydrolysates. *J. Clin. Endocrinol.*, 1951, (11), 1063-1078.
- (246) ROSENBERG I.N. — *Tr. Am. Goiter Assn.*, 1951, (224).
- (247) ROSENBERG I.N. — The nature of the circulating thyroid hormone in Graves' disease. *J. Clin. Invest.*, 1951, (30), 1.
- (248) ROUCAYROL J.C., OBERHAUSEN E., SCHUBLER R. — *Conférence sur les radioisotopes dans la recherche scientifique*, 1958, (1), 648.
- (249) ROUCAYROL J.C. et Col. — Liquid scintillations infiltrer paper. A new detector. *Nucleotics*, 1957, (15), [11], 104.
- (250) ROUCAYROL J.C. — *Coloque de biophysique SEDES*, Paris, 1961.
- (251) SANDELL E.B., KOLTHOFF I.N. — Chronometric catalytic method for the determination of micro quantities of iodine. *J. Am. Chem. Soc.*, 1934, (56), 1426.
- (252) SCHEEPER J.H. — Study of the thyroid function with 125 I and 132 I. *Jaurb. Kankeronderz, Kankerbes, trijoding Ned.*, 1964, (14), 301-302.
- (253) SCHINDLER W.J., M.C., HORSE T.S., KRAUSE D.M. — Use of technetium 99m in studying thyroid physiology in the mouse : dou-

- ble label experiment with technetium — 99m and iodine — 125. *Endocrinology*, 1966, (72), [2], 281-288.
- (254) SCHMIDT R. — La sonde à scintillation-Metalix, 1960, (25), 15.
- (255) SCHWARTZ H.L., CARTER A.L. — *Endocrinology*, 1966, (72), [2], 231-239.
- (256) SCOTT K.G., REILLY W.A. — Use of amionic exchange resin for the determination of protein bound ¹³¹I in human plasma. *Metabolism clinical Experimental*, 1954, (3), 506-509.
- (257) SEMAT. — Physique atomique et nucléaire. Gauthier-Villard, 1960.
- (258) SHAPIRO O., GORDON M.A. — An improved method for separation for radioactive thyroid hormones metabolites by thin-layer chromatography. *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, 1966, (121), 577-579.
- (259) SHELDON MILSTEIN, DUDLEY W. THOMAS. — The separation of thyroid hormones by thin-layer chromatography and their quantitative measurement. *J. Lab. Clin. Med.*, 1966, (67), 495-499.
- (260) SHIMIZU. — Isolation of iodinated compounds in rat thyroid gland by an anion exchange resin. *Kita Kanto Igoku*, 1963, (13), 290-296.
- (261) SKANCE B., HEDENSKOG I. — The determination of serum protein bound iodine by alkali incineration. Values in normal subject. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1955, (7), 291.
- (262) SPACKMAN D.H., STEIN W.H., MOORE S. — Automatic recording apparatus for use in chromatography of amino acids. *Federation Proceedings*, 1956, (15), 358.
- (263) SPACKMAN D.H., STEIN W.A., MOORE S. — *Anal. Chem.*, 1958, (30), 1190.
- (264) SPITZY H., SKRUBE H., MULLER K. — Radiochemische untersuchungen des verhaltens anorganischer ionen bei gel-filtration mit Sephadex. *Mikrochim. Acta*, 1961, (2), 296-307.
- (265) SPITZY H., SKRUBE H., MULLER K. — *J. Chromatog.*, 1960, (4), D 23.
- (266) STANBURY J.B., OKELA K., PITT-RIVERS R. — *J. Clin. Endocr.*, 1955, (15), 54.
- (267) STANLEY P.G. — The iodine-containing proteins of normal and abnormal human thyroid tissue. *Biochem. J.*, 1956, 63, 581-586.
- (268) STEIN W.H., MOORE S. — Chromatography of amino acids on starch columns. Separation of phenylalanine, leucine, isoleucine, methionine, tyrosine and valine. *J. Biol. Chem.*, 1948, (176), 337.
- (269) STEIN W.H., MOORE S. — Chromatographic determination of the amino acids composition of proteins symposia on quantitative biology. *Biological laboratory Cold Spring Harbor, N.Y.*, 1950, (14), 179.
- (270) STOUFFER J.E., JAAKONMACKI P.I., WENGER T. — Gas liquid chromatographic separation of thyroid hormones. *J. Biochem. Biophys. Acta*, 1966, (127), [1], 261-263.
- (271) STUMPF W., GRAUL E.H. — In vitro determination of thyroid function with serum T3-Test. Demonstration of protein bound I ¹³¹ labelled 1-3,5,3'-triiodothyronine by gel filtration. *Med. Klin.*, 1963, (58), 192-196.
- (272) SüE P. — *C.R. Acad. Sc.*, 1941, (212), 237.

- (273) TARANGER J.M., MILLER G., CREVAT A. — *J. de Médecine de Bordeaux*, 1961, (8), 1095.
- (274) TATA J.R. — Interaction between thyroid hormones and extra - and intracellular proteins. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, Paris, 1960, (42), 1171.
- (275) TATA J.R. — Nature of thyroxine-binding globulin in human serum. *Nature*, 1961, (189), 573-574.
- (276) TAUROG A. — *Brookhaven Symposia in Biol.*, 1955, (7), 111.
- (277) TAUROG A. — Deiodination of (131 I) thyroxine on filter paper. *Biochem. Biophys. Acta*, 1962, (60), 197-199.
- (278) TAUROG A. — Spontaneous deiodination of I 131 - labelled thyroxine and related iodophenols on filter paper. *Endocrinology*, 1963, (73), 45-46.
- (279) TAUROG A. — Spontaneous deiodination of I 131 labelled thyroid extracts on filter paper. *Endocrinology*, 1963, (73), 57-62.
- (280) TAUROG A., BRIGGS F.N., CHAIKOFF I.L. — *J. Biol. Chem.*, 1951, (191), 29.
- (281) TAUROG A., BRIGGS F.M., CHAIKOFF I.L. — I 131 labelled thyroxine - nature of the excretion product in bile. *J. Biol. Chem.*, 1952, (194), 655.
- (282) TAUROG A., CHAIKOFF I.L. — *J. Biol. Chem.*, 1947, (169), 49.
- (283) TAUROG A., CHAIKOFF I.L. — The nature of the circulating thyroid hormone. *J. Biol. Chem.*, 1948, (176), 639-656.
- (284) TAUROG A., CHAIKOFF I.L., TONG W. — On the occurrence of monoiodotyrosine in the thyroid gland. *J. Biol. Chem.*, 1949, (178), 997.
- (285) TAUROG A., CHAIKOFF I.L., TONG W. — The nature of plasma iodine as revealed by filter paper partition chromatography. *J. Biol. Chem.*, 1950, (184), 99-104.
- (286) TAUROG A., TONG W., CHAIKOFF I.L. — The monoiodotyrosine content of the thyroid gland. *J. Biol. Chem.*, 1950, (184), 83.
- (287) TAUROG A. et Coll. — *J. Biol. Chem.*, 1955, (213), 119.
- (288) THIEBLEMONT P. — Recherches sur la répartition des iodothyronines dans l'organisme et sur leur métabolisme. *Thèse Sciences*, Paris, 1961.
- (289) TISHKOFF G.H., BENNETT R., BENNETT V., MILLER L. — Radioiodine and paper chromatography technique in the study of thyroid metabolism. *Sciences*, 1949, (110), 452-454.
- (290) TONG W., CHAIKOFF I.L. — *J. Biol. Chem.*, 1958, (232), 939.
- (291) TONG W., TAUROG A., CHAIKOFF I.L. — *J. Biol. Chem.*, 1954, (207), 59.
- (292) TOMPKINS E.R. — Application of ion exchange to the separation of substances in low exchange to the separation of substances in low concentrations. *Discussions of the Faraday Society*, 1949, (7), 232.
- (293) TREVORROW V. — *J. Biol. Chem.*, 1939, (127), 737.
- (294) TREMILLON B. — Les séparations par les résines échangeuses d'ions. *Gauthier-Villards Ed.*

- (295) TOSHIRO SAKURADA. — Separation and quantitative determination of human thyroid hormones by thin-layer chromatography. *Tokoku J. Exptl Med.*, 1966, (88), [4], 367-372.
- (296) TRUNNELL J.B., WADE P. — *J. Clin. Endocrin. Metabolism.*, 1955, (15), 107.
- (297) TUBIANA M. — Les isotopes radioactifs en médecine et en biologie. *Masson Ed.*, 1950.
- (298) TUBIANA M. — L'iode radioactif et la thyroïde. *Revue du praticien*, 1958, (8), 2683.
- (299) VIGNE J., LISSITZKY S. — Dispositif pour l'enregistrement automatique continu de la radioactivité des chromatogrammes sur papier. *J. Chromatog.*, 1958, (1), 309-313.
- (300) VIGNERON L. — L'émulsion photographique et détection des particules nucléaires et cosmiques. *Conférence du Palais de la Découverte*, 1956.
- (301) VIGOUROUX E., JOST A. — Separation sur résine échangeuse d'ions ou par chromatographie sur papier des composés iodés plasmatiques marqués par ^{131}I chez le lapin. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1965, (47), [6], 1053-1071.
- (302) VISSCHER M. de, BECKERS C. — *J. Physiol.*, 1957, (49), 439.
- (303) VRIGNAUD C. — *Thèse pharmac.*, Bordeaux, 1959.
- (304) WERNER S.C. — The thyroid : fundamental and clinical test Hocber-Harper, N.Y., 1955.
- (305) WERNER S.C., BLOCK R.J. — Discrepancy between the distributions of iodine in human serum when estimated by iodine 131 and iodine 127 . *Nature*, 1959, (183), 406-407.
- (306) WERNER S.C., BLOCK R.J., MANDL R.H., KASSENAAAR A.A.H. — Pathogenesis of a case of congenital goiter with abnormally high levels of spi and with mono and diiodotyrosine in the serum. *J. Clin. Endocr. and Metabolism*, 1957, (17), 817.
- (307) WELLBY M.L. — Methods for the separation and identification of the iodine-containing amino-acids in human plasma. *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 1962, (40), 405-414.
- (308) WILMANN S. H. — Bestimmung und Bedeutung vershiedener Jodfraktivnen in biologischem material. *Z. Ges. Exp. Med.*, 1943, (112), 1-37.
- (309) WINIKOFF D., TRIKOJUS V.M. — N-diethylsulfanilamide : a reagent for the colorimetric estimation of thyroxine. *Biochem. J.*, 1948, (42), 475.
- (310) WOLLMAN S.H. — Concentration and organic binding of radioiodine by the thyroid gland. *Am. N.Y. Acad. Sci.*, 1960, (86), 354.
- (311) WYNN J. — Organic iodine constituents in human serum. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1960, (87), 120-124.
- (312) WYNN J., FABRIKANT I., DEISS W.P. — A method for extraction and chromatographic separation of plasma iodoamino acids. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1959, (84), 106-115.
- (313) YOSHIHITO YAOI. — Fractionation of peptides obtained by chymotryptic hydrolysis of bakers' yeast cytochrome C. *J. Biochem. (Tokyo)*, 1966, (52), [3], 236-246.
- (314) ZEIDLER V., GRAUL E.H. — Absence of free iodotyrosines from the plasma of the rat. *Nature*, 1965, (206), [4982], 401.

- (315) ZIEVEL, VOGEL W.C., SCHULTZ A.L. — Determination of protein-bound radio iodine with an anion exchange resin. *J. Laboratory*, 1956, (47), 663-668.
- (316) ZYL A., VAN, WILSON B. — A micromethod for specific activity analysis of ^{131}I labelled tyrosine derivatives and its use in thyroid hormone biosynthesis. *Proc. Pretoria*, 1963, 226-241.
-

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
<i>Avant-Propos</i>	5
INTRODUCTION	7

PREMIERE PARTIE

<i>CHAPITRE I. — Utilisation des radio isotopes dans l'exploration du métabolisme thyroïdien.</i>	
I. — Historique	11
II. — Orientation des composés radioactifs nécessaires à l'exploration de la fonction thyroïdienne	13
III. — Les détecteurs de particules utilisées pour les isotopes radioactifs de l' ¹²⁷ I et plus particulièrement l'iode ¹³¹ I ..	15
 <i>CHAPITRE II : Rappels sur le métabolisme thyroïdien</i>	
I. — Biosynthèse et libération des hormones thyroïdiennes ..	17
II. — Transport des hormones thyroïdiennes circulantes.....	18
III. — Catabolisme des hormones thyroïdiennes	18
IV. — Régulation de la fonction thyroïdienne	19
 <i>CHAPITRE III : Les techniques de séparation et d'identification des acides aminés iodés</i>	
I. — Analyse chimique	21
II. — L'électrophorèse	22
III. — Immunologie	22
IV. — Séparation par chromatographie sur papier	23
V. — Séparation par chromatographie sur colonne	25

	Pages
1) Chromatographie des hormones thyroïdiennes sur colonne d'amidon	26
2) Chromatographie des hormones thyroïdiennes sur colonne de Kieselgühr	29
3) Chromatographie des hormones thyroïdiennes sur colonne de D.E.A.E. cellulose	31
4) Chromatographie des hormones thyroïdiennes sur colonne de gel de Dextrane (Séphadex)	32
a) Techniques d'élution en milieu basique	33
b) Techniques d'élution en milieu neutre	35
5) Chromatographie des hormones thyroïdiennes sur résines échangeuses d'ions	36
a) Les résines échangeuses d'ions utilisées pour la séparation des hormones thyroïdiennes	36
1) Nature des résines	36
2) Propriété des résines	37
3) Application des résines à des fins analytiques : le développement par élution	38
b) Technique d'analyses séparatives des hormones thyroïdiennes utilisant les résines échangeuses d'anions.	41
1) Méthode sur Dowex IX2	41
2) Méthode utilisant les résines Dowex IX8	42
3) Application des résines échangeuses d'anions à l'étude des hormones thyroïdiennes plasmatiques.	43
c) Techniques d'analyses séparatives des hormones thyroïdiennes utilisant les résines échangeuses de cations.	44
— Séparation sur Dowex 50WX4 ..	44
d) Technique d'analyse utilisant les résines échangeuses de cations et d'anions pour la séparation des composés iodes plasmatiques	47

DEUXIEME PARTIE

CHAPITRE I : <i>Appareillage expérimental utilisé</i>	51
a) Matériel mécanique	51
b) Appareillage électronique	52

	Pages
CHAPITRE II : <i>Hydrolysats de glande thyroïde de rat</i>	55
CHAPITRE III : <i>Expérimentation portant sur quatre techniques représentatives de chromatographie sur colonnes</i>	57
a) Séparation des composés iodes minéraux et organiques de la glande thyroïde sur résines échangeuses d'anions Dowex IX2	57
Méthodes	57
Courbes autoradiochromatogramme	58
Résultats	59
Discussion	61
Conclusion	61
b) Technique de séparation des composés iodes de la thyroïde par filtration sur gel de Dextrane	61
Méthodes	61
Résultats	62
Discussion	63
Conclusion	64
Courbes autoradiochromatogramme	65
c) Analyse des acides aminés iodes et des iodures dans un hydrolysats de protéines iodées sur Dowex 50WX4	67
Méthodes	67
Résultats	71
Discussion	72
Conclusion	73
d) Etude de la séparation sur colonne par la résine Dowex 50X4 d'acides amines marqués à l'iode 131	74
Méthodes	74
Résultats	75
Discussion	76
Conclusion	79
CHAPITRE IV : <i>Méthode de Reilly W.A., Searles G.L., Scott K.G. modifiée</i>	81
Méthodes	81
Résultats	84

	Pages
Discussion	84
Conclusion	85
CHAPITRE V : <i>Séparation des composés iodés d'un même hydroly-</i> <i>sat de thyroïde par les cinq techniques précédemment étudiées.</i>	87
Conclusion générale	89
Bibliographie	91
